

Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Martin- Luther-
Universität-Halle-Wittenberg
(Direktorin: Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser)

**Immunhistochemische Untersuchungen zu Prognosefaktoren für Patienten mit
Synovial- und Leiomyosarkomen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Chris Heidenreich

geboren am 22.02.1979 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert (Betreuer)
2. Prof. Dr. med. Peter Würll (Diakonie Halle)
3. PD Dr. rer. nat. Astrid Kehlen

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 15.12.2014

Datum der Verteidigung: 06.07.2015

Referat

Synovial- und Leiomyosarkome sind zwei der häufigsten malignen Weichteiltumoren. In den letzten zwei Jahrzehnten konnte durch Weiterentwicklungen in der Sarkomchirurgie, den adjuvanten Therapieverfahren durch Chemotherapie und Bestrahlung eine Verbesserung der Überlebensraten erzielt werden. Trotz alledem sind die Langzeitprognosen erkrankter Patienten weiterhin schlecht. Häufig erleiden die Patienten in den ersten Jahren Lokalrezidive beziehungsweise entwickeln im Krankheitsverlauf Fernmetastasen, welche einen negativen Einfluss auf das Langzeitüberleben haben. In diesem Zusammenhang ist es unerlässlich, molekulare Prognosefaktoren zu identifizieren und zu untersuchen, um genauere Vorhersagen im Rahmen der Grunderkrankung zu treffen. Prognosefaktoren erlauben es, den Krankheitsverlauf statistisch vorherzusagen. Sie werden meist zum Zeitpunkt der Diagnose oder dem Behandlungsbeginn bestimmt. Dadurch können spezielle Behandlungsstrategien sowie Therapieverfahren bei entsprechender Prognose weiterentwickelt werden. Unter diesen Faktoren sind die Proteine Survivin (SvV), Carboanhydrase 9 (CA9) und Osteopontin (OPN) interessante Vertreter der Gruppe der molekularen Biomarker, welche auch in Weichteiltumoren eine wichtige Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden Synovial- und Leiomyosarkome immunhistochemisch untersucht. Dafür stand ein Tumorkollektiv von 26 Synovial- und 24 Leiomyosarkomen zur Verfügung. Die Färbungen wurden für die entsprechenden Proteine Survivin, CA9 und OPN durch die Avidin – Biotin – Methode angefertigt und mittels immunoreaktiven Score nach Remmele und Stegner ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte durch die multivariate Cox – Regressionsanalyse.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Survivin als unabhängigen prognostischen Faktor in Synovial- und Leiomyosarkomen zu identifizieren. Weiterhin konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Proteinexpression für CA9 und OPN und dem tumor-assoziierten Überleben für Synovialsarkome aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der Identifizierung von Biomarkern im Rahmen der prognostischen Aussagekraft, um gezielte Entscheidungen hinsichtlich der Behandlungsstrategien zu treffen.

Heidenreich, Chris: Immunhistochemische Untersuchungen zu Prognosefaktoren für Patienten mit Synovial- und Leiomyosarkomen. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 78 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klassifizierung von malignen Weichteiltumoren	1
1.2 Das Synovialsarkom	4
1.3 Das Leiomyosarkom	5
1.4 Die Apoptose - ein genetisch kontrollierter Prozess	8
1.4.1 Die Inhibitoren der Apoptose (IAP)	10
1.4.2 Survivin	11
1.5 Tumorhypoxie	15
1.5.1 Carboanhydrase 9	16
1.5.2 Osteopontin	17
2. Zielsetzung der Arbeit	21
3. Material und Methodik	22
3.1 Material	22
3.1.1 Patientengut, Tumorcharakteristik und Recherchen	22
3.1.2 Histologie	22
3.1.3 Graduierung	23
3.1.4 TNM-Klassifikation und Tumorstadium	25
3.1.5 Tumorlokalisierung	26
3.1.6 Resektionsart und Resektionsgrad	27
3.1.7 Antikörper	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis	28
3.2.2 Immunhistochemische Färbungen	29
3.2.3 Mikroskopie	30
3.2.4 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner	30
3.2.5 Statistische Analysen	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Alters- und Geschlechterverteilung, Überleben	32
4.2 Tumorgrad, Tumorstadium, Tumorlokalisierung und Resektionsgrad	33
4.3 Auswertung der Survivin Proteinexpression	39
4.4 Auswertung der Carboanhydrase 9 Proteinexpression	44
4.5 Auswertung der Osteopontin Proteinexpression	48
5. Diskussion	52
5.1 Survivin - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen	52

Inhaltsverzeichnis

5.2	Carboanhydrase 9 - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen	54
5.3	Osteopontin - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen	56
6.	Zusammenfassung.....	59
7.	Literaturverzeichnis.....	60
8.	Anhang.....	73
8.1	Tabellenanhang	73
8.2	Abbildungsanhang.....	76
9.	Thesen	77

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AA	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AEC	Aminoethylcarbazol
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BCL 2	B-Cell Lymphoma 2 Gen/Protein
BIRC5	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat-containing 5</i>
BIR	<i>baculovirus IAP repeats</i>
BM	Basalmembran
CA9	Carboanhydrase 9
CARD	<i>caspase-recruitment-domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK1	<i>cyclin dependent kinase 1</i>
CPC	<i>chromosomale passenger-complex</i>
ECM	Extrazellulärmatrix
EMA	Epitheliales Membran Antigen
Eta-1	<i>early t-lymphocyte activation 1</i>
FNCLCC	<i>French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group</i>
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HBXIP	<i>hepatitis B interacting factor</i>
HHF35	<i>muscle specific antigen</i>
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPF	<i>high power field</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IRS	Immunreaktiver Score
INCENP	<i>inner centromere protein antigene</i>
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

MDM2	<i>murine double minute oncogene</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NOS	<i>not otherwise specified</i>
OPN	Osteopontin
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>
PI3'K	Phosphoinositid-3'-Kinase
PET	Positronen Emissions Tomographie
PP	<i>percentage points of positive cells</i>
p53	Protein 53 (Tumorsuppressorgen/protein)
REST	Resektionsstatus
RR	Relatives Risiko
SI	<i>staining intensity</i>
SIBLING	<i>small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SPMT	Stadium des Primärtumors
SPP1	Sekretorisches Phosphoprotein 1
Sv	Survivin
TLE1	<i>transducin-like enhancer protein 1</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TSG	Tumorsuppressorgen
TUML	Tumorlokalisation
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
VHL-Gen	von Hippel-Lindau - Gen
XIAP	<i>x-linked-inhibitor of apoptosis</i>

1. Einleitung

1.1 Klassifizierung von malignen Weichteiltumoren

Als Weichteiltumoren können alle Tumoren des nichtepithelialen und extraskelettalen Gewebes, exklusive des retikuloendothelialen Systems, der Glia und des Stützgewebes der parenchymatösen Organe zusammengefasst werden [1]. Man unterscheidet zwischen benignen und malignen Weichteiltumoren. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht grundsätzlich im Wachstumsmuster bzw. Wachstumsverhalten und der Fähigkeit der Metastasierung.

Maligne Weichteiltumoren oder Weichteilsarkome sind lokal verdrängend wachsende Tumoren, mit der Fähigkeit zu rezidivieren bzw. Fernmetastasen zu bilden [1]. Es sind seltene Tumoren mesenchymalen Ursprungs und die Häufigkeit wird in der Literatur mit ca. 1% aller malignen Tumoren des Erwachsenenalters angegeben. Die jährliche Inzidenz liegt weltweit bei 1-2 pro 100000 Einwohner. So wurden z.B. 2006 ca. 9500 Neuerkrankungen in Amerika registriert [2]. Sie können prinzipiell in jedem Alter auftreten. Es sind ca. 15% der Betroffenen jünger als 15 Jahre und ca. 40% älter als 55 Jahre [1]. Männer erkranken häufiger als Frauen. Bisher wurden über 20 Sarkomentitäten mit ca. 150 Subtypen beschrieben [3]. Laut Enzinger und Weiss sind die Lokalisationshäufigkeiten wie folgt verteilt: Extremitäten mit ca. 40%, gefolgt vom Retroperitoneum / Intraabdominal / Visceral (einschließlich GIST) mit ca. 50% und dem Körperstamm / Kopf / Hals mit ca. 10% (M. D. Anderson Cancer Center Sarcoma Database von 1996 – 2006) [1].

Die Pathogenese von Weichteilsarkomen ist sehr vielschichtig und noch nicht vollständig erforscht bzw. verstanden. Zu den am häufigsten diskutierten Entstehungsursachen zählen chemische Faktoren (z.B. Asbest, Phenoxyessigsäure, Dioxin, Chlorphenol, Vinylchlorid), Erbkrankheiten (z.B. Neurofibromatose Typ I, tuberöse Sklerose, Li-Fraumeni-Syndrom, Gardner Syndrom), immunologische Defekte, Viruserkrankungen (z.B. Humaner Herpesvirus 8, Epstein-Barr Virus), Traumata und die Strahlenexposition [1, 3]. Auf molekularer Ebene wurden verschiedene Alterationen bzw. Mutationstypen nachgewiesen, wie z.B. für das Tumorsuppressorgen p53 und dem Protoonkogen MDM2, welche auch eng mit der Prognose verknüpft sind [4, 5, 6].

Diagnostik, Therapie und Prognose

Die Weichteilsarkome weisen meist ein relativ beschwerdearmes Wachstum auf. Die meisten Patienten präsentieren sich mit einem schmerzlosen Tumor der Extremitäten, wobei aber auch ca. 1/3 der Patienten über Schmerzen berichten können. Eine Fehlinterpretation des Befundes im Sinne eines z.B. Lipoms oder posttraumatischen Hämatoms führt häufig zur Verzögerung der Diagnose. Retroperitoneale Sarkome werden aufgrund ihrer Ausdehnungsmöglichkeit ebenfalls sehr spät diagnostiziert. Eine B-Symptomatik bzw. Paraneoplasie kommt sehr selten vor und tritt meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf auf. In ca. 20% der Fälle lassen sich zum Diagnosezeitpunkt Fernmetastasen detektieren [1]. Weichteilsarkome besitzen entsprechend den verschiedenen Entitäten eine relative Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie [7].

Bei Verdacht eines Weichteilsarkoms sollte die bildgebende Diagnostik (lokale Ausbreitungsdiagnostik) vor der standardmäßigen Biopsie erfolgen. Als Standardbildgebung steht die Magnetresonanztomografie (MRT) zur Verfügung. Weitere Verfahren sind Sonografie, konventionelles Röntgen sowie die Computertomografie (CT) und ggf. die Positronen-Emissions-Tomographie - CT. Als Biopsieverfahren haben sich die Inzisions-, die Feinnadelaspirations- und die Stanzbiopsie etabliert [8].

Beim Nachweis eines Weichteilsarkoms existieren multimodale Therapiekonzepte. Es ist eine gute Zusammenarbeit der verschiedenen Fachbereiche zur Wahl des sinnvollsten Vorgehens erforderlich. Der chirurgische Eingriff stellt sicherlich den wichtigsten Eckpfeiler der Therapie von Sarkomen dar [1]. Voraussetzung ist die Resektabilität des Befundes (Primärtumor, Rezidiv, Fernmetastasen). Eine R0-Situation (Residual 0 – keine Tumorzellen mikroskopisch nachweisbar), ist in jedem Fall anzustreben. Dies erfordert eine sog. weite/radikale Exzision des tumortragenden Kompartiments unter Mitnahme von Faszien bei intramuskulärer Lokalisation im Bereich der Extremitäten aber auch bei Lokalisation im Bereich des Körperstammes. Die Erhaltung der Extremität bzw. der Funktionalität hat sich mittlerweile als Goldstandard etabliert, so dass z.B. die Rate der Amputationen unter 10% gesenkt werden konnte [9, 10]. Andere Tumorlokalisationen (z.B. Retroperitoneum) unterliegen den gleichen Kriterien, obgleich ein kurativer Therapieansatz meist schwer erreichbar ist. Hierbei sind häufig multiviscerale Resektionen erforderlich [8]. Zudem existieren neoadjuvante und adjuvante Therapieverfahren in Form von Chemo- oder Radiotherapie als Einzel- bzw. Kombinationsverfahren für die verschiedenen Tumorentitäten. Auch die Anwendung der lokalen Hyperthermie in Kombination mit

Chemotherapie hat sich in Bezug auf eine Senkung des Rezidivrisikos und einer Verlängerung des krankheitsfreien Intervalls als wirksam erwiesen. Diese gesamten Therapiestrategien werden zur lokalen Tumorkontrolle und zur Risikoreduktion einer Fernmetastasierung sowie zur Verbesserung des Gesamtüberlebens eingesetzt [8]. Zum Beispiel kann bei Extremitäten erhaltenden Eingriffen mittels adjuvanter Radiatio eine Tumorkontrollrate von über 90% erreicht werden [11].

Das histologische Grading von Weichteilsarkomen erfolgt entweder dreistufig (FNCLCC) oder vierstufig (UICC) und besitzt die beste Korrelation zur Prognose [12]. Das am häufigsten verwendete Schema in Europa ist das von Coindre et al. entwickelte dreistufige System [8]. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der UICC/AJCC und bezieht die prognostisch relevanten Parameter wie Grading, Tumorgröße und Tumorlokalisation (superficial vs. profund) mit ein. Weitere Prognoseparameter sind der histopathologische Subtyp, der Resektionsstatus und die Körperlokalisation [1]. Die 5-Jahresüberlebensraten entsprechend den Stadien der UICC/AJCC liegen im Stadium I bei ca. 85-96%, im Stadium II bei ca. 72-78%, im Stadium III bei ca. 50% und im Stadium IV bei ca. 10% [8].

Die doch ungünstige Prognose von Weichteilsarkomen verdeutlicht die Notwendigkeit der stetigen Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prognose etwa durch die Identifizierung von potentiellen Biomarkern.

1.2 Das Synovialsarkom

Das Synovialsarkom ist ein hochmaligner Tumor des Weichgewebes mit meist ungünstiger Prognose. Häufig kommt es in paraartikulären Regionen der Extremitäten vor, assoziiert mit Sehnenscheiden, Schleimbeuteln und Gelenkkapseln. Seltener ist das Sarkom ohne eine Beziehung zu synovialen Strukturen, wie z.B. der parapharyngealen Region, der Bauchwand, Pleura oder dem Herz, lokalisiert. Klinische Symptome können Schmerzen, Funktionseinschränkung sowie eine tastbare Schwellung sein. Die Dauer einer Symptomatik bis zur Diagnosestellung kann zwischen Wochen und Jahren variieren. Eine B-Symptomatik ist in der Regel selten [13]. Das Synovialsarkom tritt bevorzugt zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auf. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 34 Jahren, wobei 44% der Patienten bei Diagnosestellung unter 30 Jahre alt sind [1, 14]. Mit 8 – 12% aller Weichteilsarkome beim Erwachsenen ist das Synovialsarkom der vierthäufigste maligne Weichteiltumor. Insgesamt finden sich zwischen Männern und Frauen keine großen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung [13]. Bei Kindern und jungen Erwachsenen bis zum 21. Lebensjahr beträgt der Anteil bezüglich der Weichteilsarkome 7 – 8% und ist ebenfalls die vierthäufigste Tumorentität der malignen Weichteiltumoren im Kinder und Jugendalter [15].

Die häufigsten Lokalisationen sind die oberen und unteren Extremitäten. Nach Enzinger und Weiss treten 85 – 95% der Synovialsarkome in den Extremitäten auf. Die Untersuchungen durch das Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) an 345 Patienten zeigten, dass die unteren Extremitäten mit 59,7% am häufigsten betroffen sind, gefolgt von den oberen Extremitäten mit 23,2%. Seltener Lokalisationen sind der Kopf- und Halsbereich mit circa 10% sowie die Rumpffregion mit 8% (bezogen auf die untersuchte Patientengruppe n=345). Grundsätzlich kann das Synovialsarkom in jeder anatomischen Struktur des menschlichen Körpers auftreten [1].

Histologie und Immunhistochemie

Das Tumorgewebe besteht aus epithelähnlichen Zellen und spindelzelligen Arealen in variablen Anteilen (biphasisch). In Abhängigkeit vom Verhältnis der Strukturelemente unterscheidet man histologisch vier Untergruppen. Hierzu gehören der biphasische Typ, der monophasisch fibröse Typ, der monophasisch-epitheliale Typ und der undifferenzierte Typ [1].

Eine immunhistochemische Untersuchung ist mittlerweile Standard und zur Sicherung der Diagnose des Synovialsarkoms unerlässlich. Häufig liegt eine Koexpression von Zytokeratin (CK7) und Epitheliale Membran Antigen (EMA) vor, zumindest wird eines

von beiden, in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, fast immer exprimiert [13, 16]. Ebenfalls können die Tumoren in 30% für S-100, in 60-70% für CD99 und in 75-100% für Bcl-2, membranär sowie zytoplasmatisch positiv sein. Dagegen ist der CD34-Nachweis fast immer negativ. Immunhistochemisch finden sich keine großen Unterschiede zwischen monophasischen und biphasischen Typ mit der Ausnahme, dass ausschließlich die soliden, großzelligen Areale der biphasischen Synovialsarkome eine Expression von CK 13 und CEA zeigen können [1]. TLE1 wurde 2007 als potentieller spezifischer Marker in Synovialsarkomen beschrieben, was jedoch in weiteren Studien mittlerweile in Frage gestellt wurde [17, 18].

Zytogenetik

Die meisten Synovialsarkome sind durch Translokationen zwischen den Chromosomen X und 18, t(X;18)(p11.2;q11.2) gekennzeichnet und lassen sich in allen Subtypen nachweisen. Dies führt zur Fusion des SS18(SYT)-Gens mit einem der SSX-Gene, wobei 2 Fusionsvarianten (SS18-SSX1, SS18-SSX2) entstehen [19, 20]. Die Überexpression dieser Onkogene fördert den Abbau des Tumorsuppressorproteins p53, unter Einbezug und Stabilisierung des Onkoproteins MDM2 [21]. Unabhängig vom morphologischen Subtyp haben Patienten mit SS18-SSX2 Fusionen eine geringere Rezidivrate als Patienten mit der SS18-SSX1 Variante und Tumoren mit der SS18-SSX1 Variante haben eine höhere Proliferationsrate sowie eine schlechtere Prognose [19].

Rezidive, Metastasen, Überlebensraten

Das Synovialsarkom rezidiert je nach postoperativem Residualergebnis und adjuvanten Therapiemaßnahmen in 30-80 % der Fälle. In über 50% der Fälle treten Fernmetastasen auf. Typische Lokalisation sind die Lungen mit 90% und die regionären Lymphknoten mit 10-20%. Im klinischen Verlauf, ist eine Metastasierung nach Jahrzehnten selten, aber möglich. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei ca. 40-80%, die 10-Jahresüberlebensrate bei etwa 20-63% [1].

1.3 Das Leiomyosarkom

Das Leiomyosarkom gehört ebenfalls in die Gruppe der malignen Weichteiltumoren. Die Häufigkeit wird in der Literatur mit einem Anteil von 5-25% aller Weichteilsarkomentitäten angegeben [1, 8]. Leiomyosarkome des Weichgewebes sind seltener als Leiomyosarkome des Uterus und des Gastrointestinaltraktes. Insofern unterscheidet man grundsätzlich zwischen uterinen und nicht-uterinen

Leiomyosarkomen [1]. Uterine Leiomyosarkome machen 1% der malignen Tumoren des Uterus aus und sind gleichzeitig die häufigsten Sarkome des inneren Genitaltraktes [22]. Die klinischen Symptome der Leiomyosarkome des Weichgewebes wie z.B. Gewichtsverlust, Schmerzen und Fieber, sind häufig unspezifisch. In der Regel sind Frauen häufiger betroffen als Männer [1]. Relevante Parameter sind Tumorgöße, Lokalisation, histologischer Malignitätsgrad, Staging des Tumors sowie postoperatives Residualergebnis [23].

Eine weitere Unterteilung der nicht-uterinen Leiomyosarkome erfolgt aufgrund verschiedener Lokalisationen und damit differenten klinischen sowie biologischen Aspekten. Unterschieden werden Leiomyosarkome des Retroperitoneums und des Abdomens, des Weichgewebes, der Haut sowie der großen und kleinen Gefäße. Diese Unterteilung ist sehr sinnvoll, da die Lokalisation eng mit der Prognose und entsprechenden Therapie verknüpft ist. So treten mit circa 70% retroperitoneale Leiomyosarkome am häufigsten auf und gehen aufgrund ihrer Größe (>5-10 cm) bei Diagnosestellung und Lokalisation mit einer sehr schlechten Prognose einher [24, 25, 26]. Leiomyosarkome der Haut und Unterhaut haben beispielsweise bei epidermaler Lokalisation eine günstigere Prognose gegenüber Leiomyosarkomen subkutaner Lokalisation [1]. Kinder können ebenfalls, jedoch sehr selten, erkranken. Hier ist es noch nicht eindeutig geklärt, ob unabhängig von der Lokalisation, eine bessere oder schlechtere Prognose gegenüber den Erwachsenen besteht [27, 28].

Histologie und Immunhistochemie

Histologisch werden myxoide, inflammatorische und granularzellige Leiomyosarkome unterschieden [1].

In den meisten Leiomyosarkomen kann immunhistochemisch SMA (*smooth-muscle actin*) und HMF35 (*muscle-specific-actin*) nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde Desmin als variabler Marker zwischen 50 bis nahe 100 % der Tumoren beschrieben. H-Caldesmon, ein spezifischer Marker in Muskelzellen, konnte in über 40% von Leiomyosarkomen ausfindig gemacht werden [28, 29, 30, 31, 32].

Zytogenetik

Es konnten bisher keine eindeutigen spezifischen zytogenetischen Veränderungen bestätigt werden. Es wurden aber zytogenetische Veränderungen in Form von Hypodiploidie mit dem Fehlen von Chromosom 16, 18 und 22 und strukturellen Aberrationen von Chromosom 1 gefunden. Auf den Chromosomen 3, 7, 13 und 14 fanden sich ebenfalls veränderte Regionen. Weitere Untersuchungen ergaben eine

Vielzahl von unbalancierten Genomveränderungen sowie hochgradigen Amplifikationen von fast allen Chromosomen. Des Weiteren konnten zytogenetische Unterschiede in Form von DNA – Zugewinn und DNA – Amplifikationen auf verschiedenen Chromosomen zwischen kleinen Tumoren (< 5 cm im Durchmesser) und großen bzw. sehr großen Tumoren (> 20 cm im Durchmesser) nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass mit der Tumorprogression die chromosomalen Veränderungen korrelieren [7].

Rezidive, Metastasen, Überlebensraten

Die Rezidivrate ist variabel und abhängig von der Lokalisation und dem Grading des Tumors. So ist sie bei retroperitonealen Leiomyosarkomen nach kompletter Resektion mit 50% vergleichsweise hoch gegenüber Leiomyosarkomen der Extremitäten, welche nach chirurgischen Eingriffen zwischen 10% und 25% liegt [1, 33]. Risikofaktoren bezüglich des Langzeitüberlebens und der Metastasierung sind Alter > 60, Tumorgröße, Tumortiefeninfiltration, Gefäßinfiltration, Tumorstadium sowie intraoperative Komplikationen [34, 35, 36, 37]. Vorzugsweise entstehen Metastasen in Lunge und Leber, seltener sind Lymphknoten befallen. Das Auftreten von Metastasen bei Leiomyosarkomen des Weichgewebes wird in der Literatur mit einer Rate von 44% - 45% angegeben. Interessant ist, dass Tumoren welche primär den Gefäßen zuzuordnen sind, eine hohe Metastasierungsrate aufweisen. Dies lässt auf eine bevorzugte hämatogene Aussaat schließen [38]. Die durchschnittliche 5 – Jahres Überlebensrate liegt bei 64% [1].

1.4 Die Apoptose - ein genetisch kontrollierter Prozess

Die Apoptose stellt einen Prozess des programmierten Zelltodes dar und dieser verläuft genetisch kontrolliert ab. Durch die gezielte Elimination von sich entwickelnden, alternden oder geschädigten Zellen, ohne dabei benachbarte Zellen schädigend zu involvieren, wird die Gewebshomöostase aufrechterhalten [7, 39]. Wird diesem Prozess die Kontrolle auf molekularer Ebene entzogen, so kann es zur Dysregulation der Apoptose und zur Entstehung von Tumorzellen kommen [40]. Es werden morphologisch 3 Phasen der Apoptose unterschieden.

Tabelle 1: Morphologische Phasen der Apoptose (modif. nach [7])

Phase 1	<i>Kerngröße↓, Chromatinkondensation, Ablösung, Zellschrumpfung und Bildung von Ausstülpungen</i>
Phase 2	<i>Zellorganellen kompakter, mehr Ausstülpungen, Bildung von sog. apoptotic bodies, Verdauung der apoptotischen Körper durch benachbarte Zellen oder Makrophagen</i>
Phase 3	<i>Apoptotische Körper↑, Durchlässigkeit der Zytoplasmamembran↑, Phagozytose↑</i>

Auf molekularer Ebene unterscheidet man den extrinsischen und intrinsischen Signalweg, welcher den programmierten Zelltod einleiten kann. Daraus resultierend, gibt es drei verschiedene Möglichkeiten der Zelle das Selbstmordprogramm zu realisieren. Über den extrinsischen Weg wird mittels sogenannten Todesrezeptoren, welche in der Zellmembran lokalisiert sind, und ihren Liganden die Signalkaskade im Inneren der Zelle aktiviert. Der intrinsische Modus erfolgt zum einen über pro- bzw. antiapoptotische Proteine, welche in den intrazellulären Membranen lokalisiert sind, den sogenannten Mitgliedern der Bcl-2 - Protein - Familie. Zum anderen kann über den Zellkern die Apoptose mittels Induktoren (z.B. TSG p53) sowie Inhibitoren (z.B. IAP - Survivin) intrinsisch gesteuert und reguliert werden [7].

Am Ende der Signalkaskaden erfolgt immer die Aktivierung von Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Protease). Initiatorcaspasen sind intrazelluläre Proteasen, welche nach ihrer Aktivierung die Fähigkeit besitzen, sog. Effektorcaspasen zu aktivieren, welche bestimmte Aminosäuresequenzen von Proteinen der Zelle erkennen und diese dann dort zerschneiden [7, 41]. Aufgrund der Destruktion der Zellbestandteile und den damit einhergehenden morphologischen Veränderungen kommt es zum konsekutiven Untergang und Abbau der Zelle.

1.4.1 Die Inhibitoren der Apoptose (IAP)

Die Apoptoseregulation erfolgt, neben den im Zellkern lokalisierten Induktoren und Repressoren, über zwei bekannte Genfamilien: BCL-2 Proteine und die IAP – Proteine, wobei die IAP's nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert sind (siehe Abbildung 1) [7, 42, 43]. Die Regulation erfolgt pro – bzw. antiapoptotisch. Entfaltet ein Protein seine antiapoptotische Wirkung so wird die Apoptose inhibiert. Die Inhibierung kann sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Zelltod-Signalkaskade betreffen.

Eine Dysregulation des Expressionsmuster von Apoptoseregulatoren (z.B. Survivin) kann zu einer gesteigerten Hemmung des programmierten Zelltodes und damit zum verlängerten Zellüberleben, genetischer Instabilität sowie Mutationshäufungen führen und spielt damit eine wesentliche Rolle bei der Tumorgenese. In Tumorzellen führt dies zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber externen und internen Faktoren, welche den Zelltod induzieren (siehe Abbildung 1) [40, 44, 45, 46].

Insgesamt wurden beim Menschen bisher acht IAP - Proteine beschrieben: cIAP1, cIAP2, XIAP, Livin, ILP2, NAIP, BRUCE und Survivin [43, 47]. Allesamt sind durch die so genannte BIR – Domäne (*baculovirus IAP repeat* – Domäne) gekennzeichnet, ein sich wiederholender Bereich von 70 Aminosäuren (*tandem-repeat-domain*, 1-3 Kopien), welche zur Protein-Protein-Wechselwirkung und zur Hemmung der Apoptose befähigt ist [48, 49, 50]. Zudem besitzen viele dieser Proteine, bis auf Survivin, eine C-terminale „*really interesting new gene*“-Domäne (Ring-Finger-Domäne) und eine *caspase-recruitment-domain* (CARD). Die Funktion der Ring-Finger-Domäne besteht möglicherweise in der Degradation von Proteinen bzw. der Protein-Protein-Wechselwirkung [51, 52].

Die antiapoptotische Wirkung wird über die Inhibition der Prozessierung und der Aktivierung von Caspasen erzielt [53]. Die proapoptotischen Proteine Smac/Diablo und Omi/HtrA2, welche den Mitochondrien entstammen, wirken durch Bindung und Deaktivierung von Proteinen mit einer BIR-Domäne als Antagonisten der IAPs [54, 55, 56].

Das Protein Survivin besitzt unter den IAPs eine zentrale Rolle, da es sich in vielen malignen Zellpopulationen so auch in Weichteilsarkomen nachweisen lässt und mittlerweile als prognostischer Marker, vor allem in Karzinomen, eine sehr wichtige Stellung einnimmt [57].

1.4.2 Survivin

Survivin (Synonym: BIRC5) wurde erstmals im Jahre 1997 identifiziert [58]. Das Survivin-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17q25 und kodiert ein 16,5 kDa Protein, welches im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist [59]. Es ist der kleinste Inhibitor unter den IAPs und besitzt nur eine BIR-Domäne, ohne Ring-Finger- und CARD-Domäne [57].

Bekannt sind bisher 5 alternative Spleißvarianten. Das wt-Survivin (Wildtyp, 142 Aminosäuren) enthält 4 Exone. Das 2B-Survivin (165 Aminosäuren) entsteht durch die Insertion eines alternativen Exons 2. Die Survivin- Δ 3-Variante (108 Aminosäuren) enthält eine Bcl-2-Bindedomäne, welche durch die Deletion des Exon 3 gebildet wird. Survivin-3B (120 Aminosäuren) zeichnet sich durch die Verwendung eines alternativen Exons 3 aus [60]. Die letzte bekannte Variante Survivin-2a (74 Aminosäuren) besteht aus den Exonen 1 und 2 sowie aus einem alternativen Exon 2a [61].

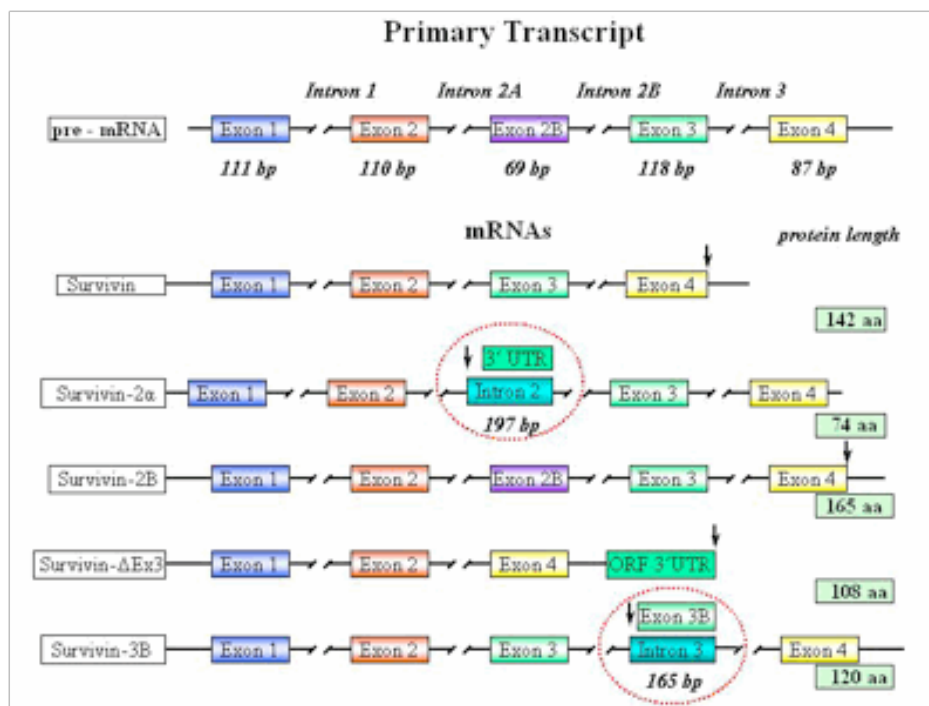


Abbildung 2: Survivin und seine Spleißvarianten (übernommen aus [62])
Abkürzungen: aa-Aminosäuren, ORF-„open reading frame“

Die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Spleißvarianten wurde bereits erforscht, wobei Survivin-3B bisher nicht genau zugeordnet werden konnte. So sind Survivin-wt und Survivin-2B vorrangig im Cytoplasma lokalisiert. Survivin- Δ 3 konnte im Nukleus identifiziert werden. Survivin-2a verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma und im Nukleus [63]. Entsprechend der Verteilung im Zytoplasma bzw. im Nukleus wird den

Spleißvarianten die Funktion der Inhibition der Apoptose und als Regulator der Zellteilung zugeschrieben [64].

Expression von Survivin

Eine Survivinexpression läßt sich in embryonalen und fetalen Geweben nachweisen. Lange Zeit glaubte man, dass Survivin in gesunden Zellen kaum exprimiert wird. Mittlerweile wurde eine Survivinexpression in normalen differenzierten Zellen [65], T-Lymphozyten [66], neutrophilen Granulozyten [67], Erythrozyten [68], Stammzellen des Knochenmarks [69], Endothelzellen [70], Mukosazellen des Gastrointestinaltraktes [71] und den Hepatozyten nachgewiesen [72]. Eine Überexpression von Survivin kann in entarteten Zellen detektiert werden [58, 73] und wurde z.B. in Neuroblastomen [74], Tumoren der Mamma [75], des Kolon und Magens [76, 77], der Lunge [78] und High-grade-Lymphomen [79] sowie in Melanomen [80] beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Survivin für verschiedene Tumorarten mit einer negativen Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht [64]. Auch in Weichteilsarkomen konnte die Überexpression von Survivin von unserer Arbeitsgruppe mittels Westerblot und ELISA-Nachweis als negativer und unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden [81].

Funktionen von Survivin

Survivin ist ein multifunktionales Protein und stellt eine wichtige Verbindung zwischen Zellzyklus (G2/M) als Regulator und der Apoptose als Inhibitor her.

Während der Zellteilungsphasen interagiert Survivin mit verschiedenen Zellzyklusproteinen wie z.B. gamma-Tubulin der Spindelzentriolen, Zentrosomen und Kinetochoren von Metaphasechromosomen (*CPC-chromosomal passenger complex*), Mitosespindeln in der Metaphase und in der späten Telophase mit den „midbodies“ („*midzone microtubule bundling structure*“) [82, 83, 84]. Als Bestandteil des CPC (Survivin/Borealin/INCENP/Aurorakinase B), welcher ein wichtiger Regulator der Zellteilung ist und die Chromosomensegregation mit der Zytokinese verbindet [85], stellt Survivin ein Schlüsselregulator der chromosomalen Ausrichtung, Segregation und Zytokinese während der Mitose dar [84, 86]. Im Prozess der Mitose wird interagierendes Survivin mittels Phosphorylierung durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (engl. *cyclin dependent kinase* - CDK1) respektive dem *maturation-promoting factor* (CDK1/CyclinB) stabilisiert und unterdrückt so die Apoptose in sich teilenden Zellen [87].

Als Inhibitor der Apoptose wird Survivin eine weitere wichtige Funktion zuteil. Die Inhibition erfolgt am ehesten durch Interaktion mit verschiedenen Regulatoren während

der extrinsisch und intrinsisch vermittelten Apoptose [57]. Survivin hemmt zum einen die direkt vermittelte Apoptose über die TNF-Rezeptoren z.B. Fas (CD95) und die Liganden z.B. TRAIL [88, 89]. Zum anderen könnte die Inhibierung durch direkte Interaktion mit den Caspasen bzw. Effektorcaspasen (z.B. Caspasen 9, 3, 7) erfolgen, was in einigen Studien beschrieben wurde [90, 91, 92], aber bis heute kontrovers diskutiert wird. Einige Autoren konnten dies widerlegen, und gaben als mögliche Ursache die fehlende CARD-Domäne zur notwendigen Caspasebindung an [93, 94]. Des Weiteren entfaltet Survivin seine antiapoptotische Wirkung mittels eines Co-Faktors HBXIP (*hepatitis B interacting factor*) und hemmt die Procaspase-9 [95]. Dohi et al. wiesen nach, dass Survivin nach Apoptosesignalen mitochondrial freigesetzt wird und mit dem Inhibitor XIAP (*x-linked-inhibitor of apoptosis*) einen stabilen Komplex bildet und ebenfalls die Caspase-9 Aktivität unterdrückt [96]. Survivin wird während all dieser Prozesse durch p53 (vermittelt über MDM2) auf mRNA- und Proteinebene negativ reguliert (*down regulation*), d.h. eine Überexpression des IAP führt zur Gegenregulation durch die entsprechenden Proteine und damit zur Verringerung bzw. Hemmung der antiapoptotischen Wirkung [97].

Ein weiterer bedeutender Mechanismus ist die Steigerung der Angiogenese über die Apoptoseinhibition in Endothelzellen. Endothelzellen welche angiogenetischen Stimuli ausgesetzt waren, wiesen eine erhöhte Expression von Survivin auf [98]. Dies könnte ein zusätzlicher Therapieansatz in Tumorzellen sein, da die Angiogenese eine wichtige Rolle im Bereich der Hypoxie und damit der Tumorbilogie spielt.

Survivin ist in viele komplexe Signalwege eingebunden, welche noch nicht vollständig verstanden sind. Es lässt sich aber postulieren, dass durch Survivin das Zellüberleben gesichert wird. Vor allem in Tumorzellen erlangt dies große Bedeutung. Bezüglich der Prognose, aber auch des Therapieansprechens könnten in Zukunft bessere Verfahren, auch bei Weichteilsarkomen, entwickelt werden. So konnten verschiedene Studien aufzeigen, dass Survivin in malignen Tumoren (z.B. Prostata-, Schilddrüsen- und Kolonkarzinome) Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapien induziert [99, 100, 101]. Mittels Inhibition von Survivin in Kombination zu entsprechenden adjuvanten oder neoadjuvanten Radiochemotherapieverfahren, könnten bessere Ergebnisse hinsichtlich des Therapieansprechens (z.B. Remission, krankheitsfreies Intervall) und damit auch der Prognoseverbesserung erzielt werden. Interessant ist, dass die Expression in den verschiedenen Kompartimenten (Zytoplasma, Nukleus) für die heterogenen Entitäten mit unterschiedlichen Aussagen zur Prognose verknüpft sein können. Somit ist Survivin als allgemeiner prognostischer Marker weiterhin zu prüfen, obgleich Survivin in verschiedenen Krebsformen als unabhängiger prognostischer Marker gesichert werden konnte und als potentieller Biomarker vielversprechend ist

[64, 81, 102]. Die folgende Abbildung (Abb.3) soll vereinfacht die wichtigsten Funktionen von Survivin zusammenfassen.

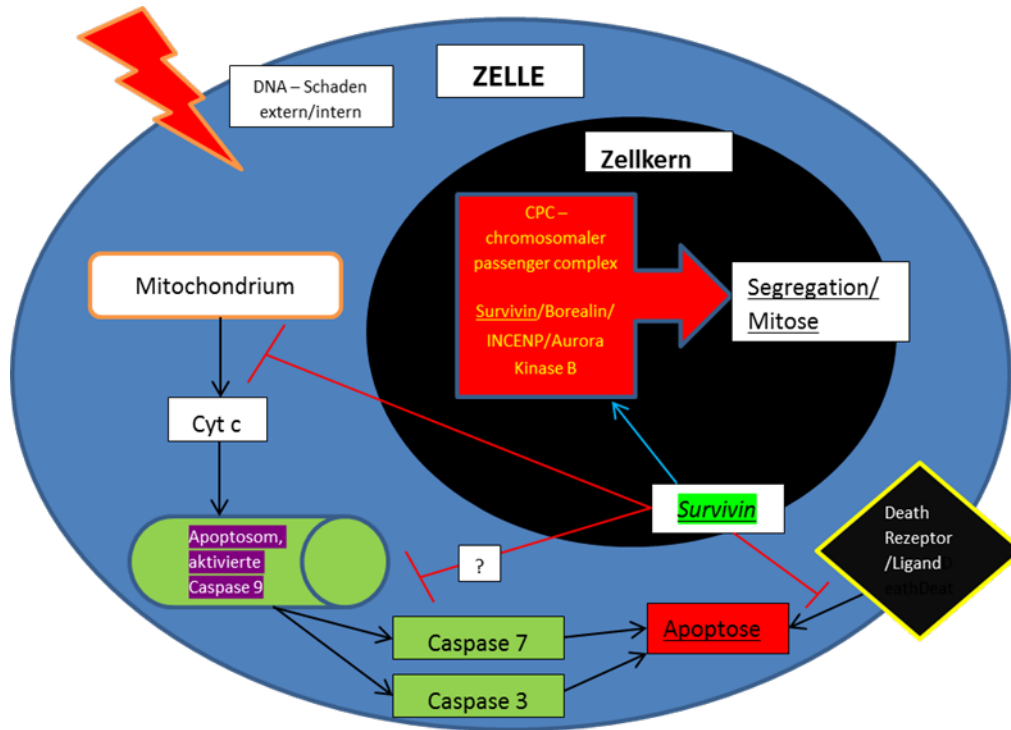


Abbildung 3: Funktionen von Survivin [modif. nach 61]. Survivin als Bestandteil des chromosomalen passengers complex (CPC) reguliert zusammen mit Borealin und INCENP (*inner centromere protein antigen*) die Aurorakinase B, welche nach Autophosphorylierung die korrekte Ausrichtung, Teilung und Kinese der Chromosomen während der Mitose unterstützt bzw. steuert. Somit stellt Survivin einen der Schlüsselregulatoren während der Chromosom- und Zellteilung dar. Weiterhin wirkt Survivin als Inhibitor der Apoptose (IAP). Nach Setzen eines DNA-Schadens wird Survivin mittels Checkpoint-Kinase (in Abbildung nicht dargestellt) hochreguliert und hemmt die intrazelluläre mitochondriale Cytochrom C Freisetzung und damit die Aktivierung der Caspasen (3, 7). Gleichzeitig erfolgt die direkte Hemmung der intramembranären „Todesrezeptoren/Liganden“. Nicht sicher geklärt ist, ob Survivin auf direktem Weg die Caspasen (3, 7, 9) hemmt. Am Ende der Signalkaskade erfolgt die konsekutive Hemmung der Apoptose und damit die Unterstützung des Tumorzellüberlebens.

1.5 Tumorhypoxie

Unter Hypoxie versteht man die unzureichende bzw. verminderte Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder von verschiedenen Gewebsregionen [103]. Die Hypoxie kann auf dem Boden verschiedener Erkrankungen entstehen und ist in diesem Fall ein pathophysiologischer Zustand. Vor allem bei Tumorerkrankungen spielt die Hypoxie eine bedeutende Rolle. Nach primärer Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff durch Diffusion, kann ab einer bestimmten Tumorgröße (ca. 3mm) die Versorgung mittels Diffusion nicht mehr aufrecht erhalten werden [104] und die Tumoren reagieren mit der Neoangiogenese, also der Neubildung von Gefäßen, welche in der Regel ungerichtet stattfindet. Die Kombination aus diffusem Zell- und Gefäßwachstum führt in Tumoren zur Ausbildung von hypoxischen Arealen. So beschrieben Vaupel und Mayer 2007 das ca. 50 – 60 % der soliden Tumoren hypoxische und anoxische Areale aufweisen, welche durch das Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation, Sauerstoffangebot und –verbrauch entstehen [105].

In zahlreichen Studien wurde die Tumorhypoxie als prognostischer Faktor mit schlechtem Einfluss beschrieben. So wurde z.B. für Prostatakarzinome [106], Kopf- und Halstumoren [107], Uterus- und Cervixkarzinome [108] aber auch für Weichteilsarkome eine Korrelation zwischen Tumorhypoxie und einem schlechteren Überleben beschrieben [109]. Die schlechtere Prognose resultiert zum einen aus einem verstärkten Progress des Tumors sowie einem erhöhten Risiko der Ausbildung von Fernmetastasen und zum anderen, aus dem schlechteren Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie [110, 111]. Zusätzlich kommt es genau wie bei der Dysregulation der Apoptose, unter Tumorhypoxie zu Mutationshäufungen mit konsekutiver genetischer Instabilität und damit einhergehender Veränderung der Tumorbiologie [112].

Unter hypoxischen Bedingungen kommt es außerdem zur Induktion bzw. zur Repression verschiedener Zielgene und damit einhergehenden Expressionsänderungen der entsprechenden Proteine. Der Haupttranskriptionsfaktor ist HIF-1 α , welcher bei einer VHL - Mutation (TSG) und unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert und entsprechende Zielgene aktiviert. Zu den unter Hypoxie aktivierten und exprimierten Proteinen, gehören u.a. die Carboanhydrase 9 und Osteopontin, welche mittlerweile als wichtige und vielversprechende Vertreter unter den diagnostischen, therapeutischen und prognostischen Markern in verschiedenen Malignomen, aber auch in Weichteilsarkomen gelten. Auf den folgenden Seiten sollen diese zwei Vertreter näher betrachtet werden.

1.5.1 Carboanhydrase 9

Die humane Carboanhydrase 9 (CA9) wurde im Jahre 1992 erstmals in der Zervixkarzinom Zelllinie HeLa nachgewiesen [113]. Das CA9 Gen befindet sich auf dem Chromosom 9p12-p13 und ist aus elf Exonen und zehn Intronen zusammengesetzt. Das kodierte Protein besteht aus 466 Aminosäuren, ist ein transmembranäres Protein an der Zelloberfläche und mit 4 Domänen (extrazelluläre proteoglykan – ähnliche Domäne, CA – katalytische Domäne, transmembranäre und zytoplasmatische Domäne) ausgestattet.

Die CA9 gehört der Gruppe der Carboanhydrasen an, von denen bisher 14 Isoformen beschrieben wurden und ein Teil in verschiedenen Zellkompartimenten und humanen Geweben physiologisch vorkommt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Lokalisationen der Carboanhydrasenisoformentypen

Isoformen - Carboanhydrasen	Lokalisation
CA-I, -II, -III, -VII, -XIII	Zytoplasma
CA-IV, -IX, -XII, XIV	Zellmembran
CA-V	Mitochondrium
CA-VI	Sekretorisch (Speichel)

Carboanhydrasen sind Zink-Metalloenzyme welche die reversible Hydratation von Kohlenstoffdioxid (CO₂) katalysieren. Das heterogene Verteilungsmuster der Isoenzyme in den humanen Geweben weist auf ihre unterschiedlichen Funktionen hin. Sie spielen in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen wie z.B. dem Gasaustausch, der pH-Regulation (Säure-Base-Haushalt), dem Ionenaustausch, Glukoneogenese und vielen mehr, eine wichtige physiologische Rolle.

Expression der CA9

Eine Expression von CA9 lässt sich in einer begrenzten Anzahl im gesunden Gewebe z.B. dem Gastrointestinaltrakt, der Gallenblase und dem Gallengangsystem, sowie dem Hoden und dem Ovar nachweisen [114]. Eine heterogene Expression bzw. Überexpression findet sich in vielen malignen Zellpopulationen wie z.B. bei Nierenzell- und Mammakarzinomen [114], Kopf-Hals Tumoren [115], nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen [116] und Zervixkarzinomen [117]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die CA9 Überexpression bzw. Coexpression mit HIF-1α oder Ki-67 in oralen Plattenepithelkarzinomen [118] und Kopf-Hals Tumoren [115] mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist und sich auch als unabhängiger

prognostischer Marker in Kombination mit anderen potentiellen Markern etabliert. Jedoch gibt es bisher nur wenige Daten, welche CA9 in Weichteilsarkomen als alleinigen prognostischen Marker untersucht haben [119].

Funktionen der Carboanhydrase 9

Funktionen der CA9 sind wie oben beschrieben auf physiologischer Ebene im gesunden Gewebe, aber auch in Malignomen zu finden. So spielen sie in Tumoren eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, der Tumorgenese und –progression sowie beim Tumorzellüberleben [120]. Die CA9-Expression wird durch Hypoxie induziert, wobei HIF-1 α als Aktivator fungiert. HIF-1 α bindet im Bereich der Promoterregion des CA9 Gens und leitet die Transkription ein. Dies ist vor allem in Tumorzellen der Fall, da hier unter hypoxischen Bedingungen meist eine Akkumulation von HIF-1 α vorliegt und damit möglicherweise eine Überexpression induziert wird.

So ist die CA9-Expression auch für ein schlechteres Therapieansprechen auf Chemo- bzw. Strahlentherapie in ihrer Funktion zu betrachten. Eine Möglichkeit wäre, dies aus den hypoxischen Bedingungen in Tumoren zu erklären, welche zu einer schlechteren Erreichbar- und Wirksamkeit der Zytostatika, aufgrund des angiogenetisch bedingten höheren Gefäß/Zell Abstandes und der geringeren Proliferationsrate, führen. So zeigten Span et al., dass Mammakarzinompatientinnen mit niedrigen CA9-Expression eher von einer adjuvanten Therapie profitierten, als diejenigen, mit einer hohen CA9-Expression [121]. Demgegenüber konnten neuere Arbeiten ein gutes Therapieansprechen und eine bessere Überlebensprognose z.B. mit Interleukin 2 und „*drug targeting*“ beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom mit einer Überexpression von CA9 nachweisen [122]. Dies zeigt deutlich, dass die Rolle von CA9 tumorspezifisch betrachtet werden muss und in den verschiedenen Malignomen weiterer Klärungs- und Handlungsbedarf für die CA9 bezüglich diagnostischer und therapeutischer, aber auch prognostischer Relevanz besteht. Daraus resultierend ist es notwendig, auch die Weichteilsarkome auf diesen endogenen Marker zu untersuchen.

1.5.2 Osteopontin

Das humane Osteopontin (OPN; Synonyme: SPP1, ETA-1) ist ein multifunktionales Glykophosphoprotein der extrazellulären Matrix, welches erstmals im Jahre 1979 aus transformierten malignen Säugetierzellen isoliert wurde [123]. Das OPN-Gen ist auf dem Chromosom 4q21-q25 lokalisiert [124]. Insgesamt besteht OPN aus 314 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 44-75 kDa [125]. Es wurden bisher 3 Spleißvarianten beschrieben: Osteopontin-a besteht wie das Gen aus 7

Exonen, Osteopontin-b bei dem das Exon 5 und Osteopontin-c bei dem das Exon 4 fehlt [126] (siehe Abbildung 4).

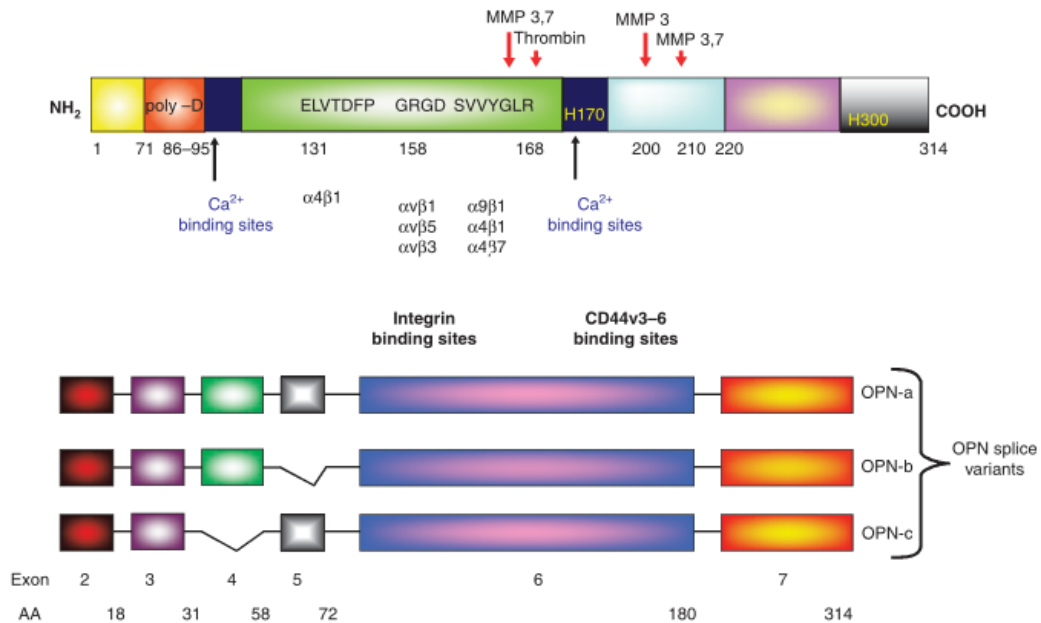


Abbildung 4: OPN Struktur und seine Spleißvarianten (übernommen aus [127])
Abkürzungen: MMP-Matrixmetalloproteinase,
CD-Cluster of Differentiation

Expression von Osteopontin

OPN wird in vielen Zelltypen von gesunden Organen bzw. Geweben des Menschen wie z.B. den Osteoklasten und Osteoblasten des Knochens, den Epithelzellen der Mamma, der Niere und der Haut, den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Gallenblase, aber auch in Nervenzellen und Immunzellen exprimiert [128] [129]. Auch in Geweben vom Endometrium, der Plazenta und dem Pankreas lässt sich eine OPN-Expression nachweisen [130].

In vielen Tumoren wurde in zahlreichen Publikationen immunhistochemisch im Gewebe eine erhöhte OPN-Expression, sowie im Plasma von Patienten eine erhöhte Konzentration beschrieben. Diese konnte z.B. in Lungen-, Magen-, Mamma-, Oesophagus-, Prostata- und Ovarialtumoren, sowie in Weichteiltumoren detektiert werden [131, 132]. Die erhöhten Expressionen und Konzentrationen von OPN sind mit der Tumorprogression, einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert. Deutliche Korrelationen bestehen aber auch mit Parametern wie dem Grading, dem Tumorstadium und der Größe der Tumoren [133]. Die Assoziationen lassen sich mittlerweile in ca. 34 Malignomarten belegen. So zeigt

sich OPN als Marker in Mamma-, Kolorektal-, Kopf und Hals-, Lungen-, Leber- und Prostata Tumoren sowie in Melanomen. In den Metastasen der o.g. Tumoren, außer in Ovarialtumoren, ist OPN ebenfalls überexprimiert [134]. Auch in Weichteilsarkomen wurde OPN als prognostischer Marker identifiziert. Eine erhöhte OPN-Expression, nachgewiesen mittels ELISA, erwies sich als negativer unabhängiger Marker bezüglich des Gesamtüberlebens bei Weichteilsarkompatienten [131]. Ferner wurden die einzelnen Spleißvarianten und deren mRNA-Expression in Weichteilsarkomen untersucht und auch hier ergab sich vorrangig für OPN-a und OPN-b eine negative prognostische Aussagekraft hinsichtlich des Gesamtüberlebens, wobei sich OPN-b und OPN-c als negative Marker in Bezug zu bestrahlten Patienten und deren Risiko am Tumor zu versterben, erwiesen [135]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass OPN unter hypoxischen Bedingungen in verschiedenen Tumoren überexprimiert wird. Somit wird OPN als potentieller Hypoxiemarker diskutiert [136]. So konnte z.B. in Kopf-Hals Tumoren eine Assoziation zwischen einer Überexpression bzw. hohen Plasmakonzentrationen von OPN und stärker hypoxischen Tumorarealen hergestellt werden. Gleichzeitig war diesbezüglich eine schlechtere Prognose für die Patienten zu verzeichnen [137].

Funktionen von Osteopontin

Wie schon erwähnt, ist Osteopontin ein multifunktionales Protein und gilt als potentieller Hypoxiemarker. Es ist an vielen physiologischen Prozessen regulativ beteiligt, wie z.B. den Knochenumbauvorgängen durch Inhibierung des Mineralisationsprozesses [138], der Wundheilung (Zellproliferation, Fibrose), der Kalziumhomöostase der Nieren, der Laktation, der Angiogenese sowie immunologischen und inflammatorischen Vorgängen [127, 139]. Aber auch als Regulator bei der Tumorprogression, der Metastasierung im Rahmen der Zellproliferation, Zellinvasion, Zellmigration und Angiogenese, sowie der Apoptosehemmung, spielt OPN eine wesentliche Rolle [140, 141, 142].

Um diese vielfältigen Prozesse zu realisieren, ist OPN auf zellulärer Ebene in komplexe Signalwege eingebunden. Dies geschieht über die Bindung an sog. oberflächenassoziierte Integrine (Transmembranproteine), welche maßgeblich für die intrazelluläre Signalübermittlung, der Zell-Zell- und der Zell-Matrix Interaktion verantwortlich sind [143]. Ein weiteres wichtiges Oberflächenmolekül, welches eine Bindung mit OPN eingeht, und eine intrazelluläre Signaltransduktion einleitet, ist CD44. OPN selbst verfügt über zahlreiche Bindestellen, wie z.B. für Kalzium, Heparin und Thrombin [129, 144]. Zudem verfügt OPN über verschiedene Regionen (Aminosäuresequenzen im N-terminalen Bereich), welche die Bindungen an die

oberflächenassoziierten Integrine vermittelt. Die ELVTDFP-Sequenz enthält eine Bindestelle für das Integrin $\alpha_4\beta_1$. Die Bindung an $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ Integrine erfolgt über das GRGDS-Motiv [145]. Eine weitere Interaktion findet über $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ Integrine der Leukozyten mittels der SVVYGLR Sequenz statt [146]. Ein zusätzlicher funktioneller Aspekt ist die Zugehörigkeit zur SIBLING-Proteinfamilie (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*) neben dem Dentin Matrixprotein 1 (DMP1), dem Dentin Sialoprotein (DSPP) und dem extrazellulären Matrixphosphoglycoprotein (MEPE), welche hauptsächlich in mineralisiertem Gewebe wie Zähnen und Knochen lokalisiert sind. Ihre Funktion besteht in der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [147, 148].

Es konnte z.B ein OPN-Integrin ($\alpha_v\beta_3$) vermittelter Zellschutz vor induzierter Apoptose durch TRAIL an Endothelzellen gezeigt werden [149]. Auch in Mammakarzinomen konnte ein Apoptoseschutz über o.g. Integrine identifiziert werden [150]. Liu et al. beschrieben zudem in Magenkarzinomzellen eine OPN vermittelte Caspase 3 Hemmung [151]. Die antiapoptotische Wirkung wird ebenfalls über die Aktivierung von BCL-Proteinen realisiert [152]. Über die Interaktion mit CD44 und der Aktivierung der PI3K/Akt-Signaltransduktion wird die Zellmotilität, das Zellwachstum und das Zellüberleben reguliert [127].

Die chemotaktische Wirkung von OPN mit Einfluss auf die Adhäsion und Migration, ist eine weitere wichtige Funktion. Dies wird ebenfalls über die Bindung an Integrine und CD44 vermittelt. Im Rahmen der Tumorgenese führt dies zur verstärkten Metastasierung und Invasivität [153]. Auch die Degradation der Basalmembran (BM) und der Extrazellulärmatrix (ECM) spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Metastasierung und der Tumorprogression. So ist die Aktivierung der schon genannten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und des sog. Urokinase-Plasminogen-Aktivator-(uPA) Systems, welche die BM und die ECM proteolytisch degradieren, von großer Bedeutung [154]. Die Aktivierung beider Systeme wird über NF- κ B/I κ B α /IKK vermittelt, welche von der PI3K/Akt Induktion abhängig ist. Somit stellt OPN auch einen wichtigen Regulator an dieser Stelle dar [155]. Im Rahmen der über Integrin vermittelten Endothelzellmigration und –proliferation sowie Apoptosehemmung beeinflusst OPN die Neovaskularisation vor allem in Tumoren [156, 157].

Anhand der oben genannten Funktionen, zeigt sich OPN als interessanter Vertreter in der Gruppe der Biomarker. Vor allem bei der Tumorphoxie, aber auch beim Zellschutz in Tumoren spielt OPN eine wichtige Rolle. Mittels Inhibierung von OPN könnten im Bereich der Tumorprogression und der Metastasierung entsprechende adjuvante bzw. neodajuvante Schemata zur Verbesserung der Prognose entwickelt werden.

2. Zielsetzung der Arbeit

Weichteilsarkome sind seltene Tumoren im Kindes- und Erwachsenenalter. Die diagnostischen und therapeutischen Strategien bezüglich der Prognose und der Lebensqualität der Patienten, haben sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Dies konnte jedoch nur durch wissenschaftliche Erkenntnisse auf dem Boden vieler Arbeiten realisiert werden. Trotzdem ist die Prognose für viele Betroffene aufgrund von Rezidiven, Fernmetastasen aber auch teilweise mangelnden klinischen Standards weiterhin schlecht. Aus diesem Grund ist es unabdingbar, diese Strategien zu verfeinern und weiter zu entwickeln. Die Identifizierung von molekularen Markern wird mittlerweile im Rahmen der diagnostischen, therapeutischen und prognostischen Aussagekraft aufgrund der Heterogenität der Sarkome gefordert. Unter diesen Markern könnten der Apoptosinhibitor Survivin sowie die potentiellen Hypoxiemarker CA9 und OPN wichtige Vertreter werden, wobei ihre diagnostische, therapeutische und prognostische Bedeutung, auch bei Weichteilsarkomen, in verschiedenen Studien schon aufgezeigt, aber noch nicht umfassend nachgewiesen werden konnte. Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurde das Tumorkollektiv lichtmikroskopisch auf die Expression von Survivin, CA9 und Osteopontin untersucht und mittels IRS Score ausgewertet. Im Anschluss daran erfolgte eine Auswertung der immunhistochemischen Nachweise mit dem tumor-spezifischen Überleben. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Bedeutung die Proteinexpression von Survivin, Carboanhydrase 9 und Osteopontin als prognostischer Biomarker für Synovial- und Leiomyosarkome hat.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Patientengut, Tumorcharakteristik und Recherchen

Untersucht wurden 50 Tumoren davon 26 Synovial- und 24 Leiomyosarkome. Davon waren 34 Primärtumoren, 11 Rezidive und 5 Metastasen (siehe Tabelle 4). Das Tumormaterial war in Paraffin eingebettet. Die Sammlung entstand zwischen 1979 und 2005 und stammte aus dem Institut für Pathologie, Martin Luther Universität-Halle; der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universität Leipzig; dem Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und dem Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Es wurden von jedem Tumorblock jeweils 4 Schnittpräparate für HE-, Survivin-, Osteopontin- und Carboanhydrase 9-Färbungen angefertigt. Die HE – Schnittpräparate wurden durch Herrn Prof. Dr. H.J. Holzhausen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle erneut histologisch untersucht und hinsichtlich der Dignität, des Gradings und des Stadiums nochmals bestätigt bzw. ergänzt.

Die retrospektiv fehlenden klinischen Daten wurden durch entsprechende Recherchen vervollständigt. Dies erfolgte durch Einsichtnahmen in die Übersichtsberichte des Tumorzentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, pathologische Berichte aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle und des Zentrums für muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ebenfalls erfolgten schriftliche Anfragen an ambulante Niederlassungen (Gemeinschaftspraxis Rohrberg/Hurtz/Schmidt/Frank-Gleich, Halle; Dr. med. W. Reichelt, (Facharzt für Allgemeinmedizin, Helbra). Weiterhin wurden bezüglich fehlender Überlebensdaten verschiedene Einwohnermeldeämter mittels Schriftverkehr zu Rate gezogen (Stadt Nürnberg, Kösching, Sachsen bei Ansbach, Waldsassen, Offenbach am Main).

3.1.2 Histologie

Die Tumoren (Primärtumor, Rezidiv, Metastase) wurden in den Zeiträumen von 1979 – 2005 diagnostiziert. Eine histologische Begutachtung erfolgte im Zeitraum 2006 - 2007 durch Herrn Prof. Dr. H.J. Holzhausen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle, zur erneuten Sicherung der Entitäten und ergänzenden

Beurteilungen bezüglich unvollständiger klinischer Parameter (Grading, Tumorstadium, Subklassifizierung) an HE-gefärbten Paraffinschnitten.

Die Klassifizierung erfolgte nach den Empfehlungen von Enzinger und Weiss (2008). Es konnten 7 biphasische, 4 monophasisch-epitheliale, 12 monophasisch-fibröse und 3 undifferenzierte Synovialsarkome klassifiziert werden (siehe Abb.5). Die 24 Leiomyosarkome wurden hinsichtlich der Sybtypisierung nicht untersucht bzw. kategorisiert.

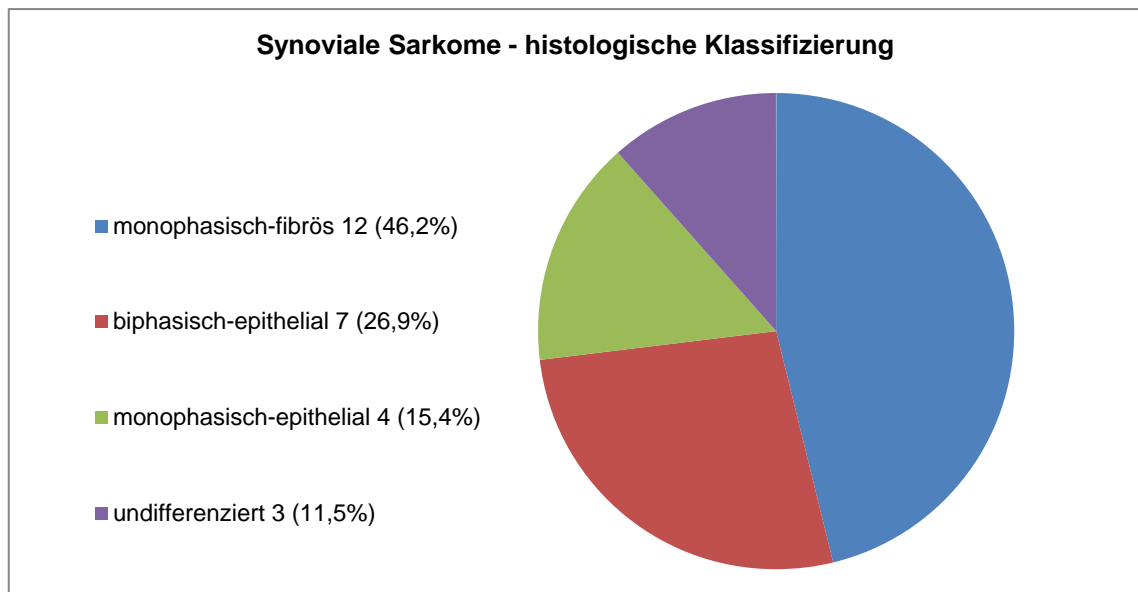


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Subtypen für Synovialsarkome

3.1.3 Graduierung

Multifaktorielle Gradingssysteme für Weichteilsarkome existieren seit den 80er Jahren. Trojani et al. entwickelten 1984 das erste System unter Berücksichtigung von Tumordifferenzierung, Mitosezahl und dem Vorhandensein von Nekrosen [7, 158]. Es wurden weitere Systeme so z.B. von Myhre Jensen, Costa, Coindre, Hashimoto und van Unnik in den 80er und 90er Jahren erstellt [159, 160, 161, 162, 163]. Zudem lassen sich die Gradingssysteme in dreistufige (FNCLCC) und vierstufige (UICC) Klassifikationsschemata unterteilen.

Es ist schwierig, ein geeignetes Grading für alle Weichteilsarkomentitäten zu etablieren, da die verschiedenen Scoring-Parameter eines Grading-systems nicht für alle Sarkomtypen als gleichwertig zu betrachten sind [7].

Bei der Graduierung der Synovial- und Leiomyosarkome wurde das System nach van Unnik et al. [163] angewendet. Bei diesem relativ einfachen dreistufigen

Klassifikationssystem werden als Parameter die Tumornekrosen und die Mitosen/10 HPF beurteilt und mit Bewertungszahlen von 0-2 versehen, und nach entsprechender Einordnung ergeben sich die Malignitätsgrade von 1-3 (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3: Drei- und vierstufiges Grading nach FNCLCC und UICC (aus [8])

	Grading dreistufig (FNCLCC)	Grading vierstufig (UICC)
niedriggradig	Grad 1	Grad 1
		Grad 2
hochgradig	Grad 2	Grad 3
	Grad 3	Grad 4

Tabelle 4: Grading System nach van Unnik modif. nach [7]

Mitosen/10 HPF – Bewertungszahl(BZ)	Nekrosen – Bewertungszahl(BZ)
<3 - BZ 0 3-20 - BZ 1 >20 - BZ 2	Keine Nekrosen - BZ 0 Nekrosen vorhanden - BZ 1

Bewertungszahl Mitosen	Bewertungszahl Nekrosen	Malignitätsgrad
0	0 bzw. 1	1
1 oder 2	0 bzw. 1	2
2	1	3

3.1.4 TNM-Klassifikation und Tumorstadium

Die Bestimmung der Tumorstadien erfolgte nach den UICC/AJCC-Richtlinien. Hierbei werden das Grading, die Tumorgröße, die Tumortiefe sowie Lymphknoten- oder Fernmetastasen berücksichtigt (siehe Tabelle 5 und 6) [1]. Diese Parameter bilden die Grundlage der Stadieneinteilung, wobei das Grading, die Tumorgröße und die Tumortiefe (superficial/profund) prognostisch relevant sind [8].

Entsprechend den Stadien wurden für das Tumorkollektiv die Ziffern 1-4 vergeben, wobei Stadium Ia/b und Stadium IIa/b jeweils zu 1 und 2 zusammengefasst wurden.

Tabelle 5: TNM – Klassifikation (Kurzfassung UICC/AJCC 2010) modif. nach [8]

Klassifikation nach TNM	Parameter
T1	< 5 cm
T1a	Superficial (oberflächlich)
T1b	Profund (tief)
T2	> 5 cm
T2a	Superficial (oberflächlich)
T2b	Profund (tief)
N1	Lokoregionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Anmerkung: Ein oberflächlicher Tumor ist vollständig oberhalb der oberflächlichen Faszie lokalisiert und infiltriert diese nicht. Hat ein Tumor Kontakt zur Faszie, infiltriert diese oder liegt unterhalb, handelt es sich um eine tiefe Lokalisation. Neben mediastinalen, retroperitonealen und pelvinen Tumoren handelt es sich bei den folgenden Lokalisationen definitionsgemäß um tiefe Tumoren: Kopf, Nacken, Axilla, paraspinal, Leistenbeuge, Schenkeldreieck, Kniekehle, Ellbeuge, Hand- und Fußwurzel, Ferse und Mittelfuß [8].

Tabelle 6: Stadieneinteilung (UICC/AJCC 2010) modif. nach [8]

Stadium	Grad	T	N	M
IA	G1/G2	T1a/b	N0	M0
IB	G1/G2	T2a/b	N0	M0
IIA	G3/G4	T1a/b	N0	M0
IIB	G3/G4	T2a	N0	M0
III	G3/G4	T2b	N0	M0
IV	jedes G	jedes T	N1	M0
	jedes G	jedes T	jedes N	M1

3.1.5 Tumorlokalisation

Grundsätzlich unterscheiden sich die bevorzugten Lokalisationen für beide Tumorentitäten. So treten die Synovialsarkome am häufigsten im Bereich der Extremitäten und die Leiomyosarkome im Bereich des Retroperitoneums auf (siehe Einleitung). Die verschiedenen Tumorlokalisationen mit Bezifferung zur klinischen und statistischen Datenerfassung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Einteilung der Lokalisationen

Ziffer 1-6	Lokalisationen	Ziffer 7-12	Lokalisationen
1	Kopf	7	Bauchwand
2	Hals	8	Intraabdominal
3	Obere Extremität	9	Retroperitoneal
4	Schulter	10	Hüfte/Becken/Gesäß
5	Thoraxwand	11	Untere Extremität
6	Intrathorakal/mediastinal	12	multilokulär

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungsmuster und der geringen Fallzahl wurden die Lokalisationen nach ihrer Häufigkeit in Reihenfolge zusammengefasst (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Einteilung der zusammengefassten Lokalisationen

Ziffer	Zusammengefasste Lokalisationen
1	Extremitäten, Becken/ Hüfte/Gesäß, Schulter
2	Körperstamm - Thorax-/Bauchwand, intrathorakal/mediastinal
3	Kopf/Hals
4	Abdomen/Retroperitoneum
5	Multilokulär

3.1.6 Resektionsart und Resektionsgrad

Die Resektionsart und der Resektionsgrad sind wichtige Parameter im Rahmen der klinischen Datenerfassung und haben prognostische Relevanz. Die chirurgische Therapie bestimmt die Resektionsart und wird in Tabelle 9 dargestellt. Auch hier erfolgte die entsprechende Zuordnung und Bezifferung. Entsprechend der Radikalität und der vollständigen bzw. unvollständigen Entfernung des Tumorgewebes wurden die einzelnen Eingriffe zusammengefasst. Der Resektionsgrad wird als R0 – R2 (R = Residual) angegeben (siehe Tabelle 10). Für die 50 Patienten konnte der gesamte Resektionsstatus erfasst und eingepflegt werden.

Tabelle 9: Einteilung der Resektionsarten

Resektionsart	Radikalität
<ul style="list-style-type: none"> • Primäre weite Exzision • Primäre Kompartimentresektion • Primäre Gliedmaßenamputation 	Vollständige Entfernung des tumortragenden Gewebes (radikale Entfernung – R0)
<ul style="list-style-type: none"> • Primäre Tumorausschälung • Palliative Tumormassenreduktion 	Es besteht ein Tumorrest aufgrund der eingeschränkten Resektabilität (nicht radikale Entfernung – R1 bzw. R2)

Tabelle 10: Einteilung des Resektionsgrades

Resektionsgrad	Beurteilung
R0	Vollständige Entfernung des Tumors, mikroskopisch ist der Absetzungsrand frei von Tumorzellen
R1	Vollständige Entfernung des Tumors, mikroskopisch reichen die Tumorzellen bis an den Absetzungsrand heran bzw. darüber hinaus, makroskopisch kein Tumor zu eruieren
R2	Keine vollständige Entfernung des Tumors, makroskopischer Nachweis von Tumorgewebe

3.1.7 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper gegen Survivin, CA9 und OPN sind in der Tabelle 11 aufgelistet. Eine Reaktion gegen Survivin erfolgte im Zytoplasma und im Kern, für CA9 im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas und für OPN im Zytoplasma. Die Positivkontrollen wurden an den empfohlenen Geweben der Hersteller durchgeführt. Die Negativkontrollen erfolgten mittels Antikörperverdünnungsmedien ohne Primärantikörper.

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper, Beschreibung und Vorbehandlung

Antikörper (primär)	Name	Hersteller	Vorbehandlung	Verdünnung	Positivkontrolle
Sv Kaninchen	AF 886	RD Systems	30 min in für 20 min im Dampfgerar vorgewärmtes Natriumcitrat pH=6	1:400	Kolonmukosa
CA9 Maus	MN75Mab	Bayer Healthcare		1:100	Nierenzellkarzinom
OPN Maus	NCL-O - PONTIN	Novocastra		1:50	Gallenblase

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis

Der immunhistochemische Nachweis von Survivin, CA9 und Osteopontin erfolgte mittels der Avidin – Biotin – Komplex – Methode. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin (68 kDa), 4 Moleküle des Vitamins Biotin physisch zu binden [164].

Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Ein Sekundärantikörper, welcher mit Biotin konjugiert ist besitzt die Fähigkeit, sich an den Primärantikörper zu binden. Mittels des Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin Komplexes wird das Biotin des Sekundärantikörpers durch die freien Stellen des Avidins gebunden. Die Peroxidase reagiert mit einem geeigneten Farbstoff (Chromogen), wodurch die Antigene sichtbar gemacht werden.

Diese indirekte Färbemethode besitzt aufgrund der ausgeprägten Affinität des Avidin gegenüber dem Biotin eine hohe Sensibilität.

3.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Es wurden jeweils vier 2-4 µm dicke Paraffinschnitte der vorhandenen Tumorblöcke angefertigt und auf die Objektträger aufgezogen. Die Paraffinschnitte wurden 2 Stunden bei 60°C getrocknet und anschließend mit Xylol entparaffiniert (mind. 2 x 5 Minuten). Danach erfolgte die partielle Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe bis zur Spülung mit Aqua dest.

Für die Antigendemaskierung wurden für alle 3 Antikörper die Schnittpräparate in gleicher Art und Weise für 30 Minuten im vorgewärmten Natriumcitrat (für 20 Minuten im Dampfgerät) bei pH-6 vorbehandelt.

Anschließend erfolgte nach der Abkühlung für 20 Minuten im Kochpuffer und Spülung mit Aqua dest., die Inkubation in 3%iger H₂O₂-Lösung für 7-10 Minuten. Durch diesen Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert. Danach Spülung mit Aqua dest. und Hinzugabe von Puffer (PBS für Svv, CA9, OPN).

Als nächster Schritt wurde ein Proteinblock zur Minimierung von unspezifischen Gewebsreaktionen z.B. unerwünschten Hintergrundfärbungen, durch Inkubation für 5 Minuten mit einer geeigneten Blockierungslösung (Zytochem Plus HRP Kit, Zytomed Systems Berlin) durchgeführt.

Dann erfolgte die Markierung mit dem Primärantikörper für 30 Minuten bei 37°C (die entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper sind in Tabelle 12 dargestellt).

Anschließend erneute Spülung mit Puffer (PBS). Nun wurde die Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (polyvalenter Brückenantikörper, Broad Spectrum) eingeleitet.

Nach nochmaliger Gabe von Pufferlösung wurde der Peroxidase-Avidin-Biotin-Komplex (HRP – Zytochem Plus HRP Kit von Zytomed Systems Berlin) hinzugegeben. Es schloss sich eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Im Anschluss wurde nach Spülung mit Pufferlösung das Chromogen AEC (Aminoethylcarbazol) für 10 Minuten hinzugegeben, um eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase zu realisieren. Das Chromogen AEC bildet am Ort des Zielantigens ein rotbraunes Reaktionsprodukt. Nachdem mittels Leitungswasser und Aqua dest. erneut gespült wurde, erfolgte zum Schluss eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 40-60 Sekunden, Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten und Eindecken der Objektträger mit Glyceringelatine.

3.2.3 Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Objektträger erfolgte mit dem Mikroskop Leica DM LS der Firma Leica Mikroskopie und Systeme GmbH (Objektiv: 40x, Okular 10x) durch Herrn Prof. Dr. med. H.J. Holzhausen und mich selbst.

3.2.4 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Bewertet wurden die Schnittpräparate nach dem sog. Immunreaktiven Score (IRS), welcher eine semiquantitative Beurteilung zulässt. Es werden als Faktoren die Färbeintensität (SI = *engl. staining intensity*) und der Prozentsatz positiver Färbeanteile (PP = *engl. percentage points of positiv cells*) verwendet. Die ermittelten Punktwerte ergeben multipliziert das Produkt welches den IRS-Wert widerspiegelt, wobei Werte von 0 – 12 Punkten möglich sind (siehe Tabelle 12).

Die Auswertung erfolgte für Survivin, CA9 und OPN nach den vorgegebenen Werten für den IRS Score. Die Auswertung der Antikörperreaktion gegen Survivin, erfolgte aufgrund der simultanen Färbungen der Zellkerne und des Zytoplasmas für beide Reaktionen getrennt, also IRS^{Kerne} und IRS^{Zytoplasma}.

Die mikroskopischen Untersuchungen und Bewertungen wurden durch einen erfahrenen Pathologen (Herrn Prof. Dr. H.J. Holzhausen) und mich durchgeführt.

Tabelle 12: IRS – Berechnung und Bewertung

Färbeintensität(SI)	Faktor	Färbeanteil	Faktor	IRS	Bewertung
keine	0	kein Anteil	0	0 – 2	negativ
schwach	1	1–10 %	1	3 – 4	schwach positiv
moderat	2	11–50 %	2	6 – 8	moderat positiv
starke	3	51– 80 %	3	9 – 12	stark positiv
		>80 %	4		

3.2.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Die Assoziationen zwischen den immunhistochemischen Färbungen und den klinischen Daten wurden anhand des Chi²-Test errechnet. Klinische einbezogene Daten waren z.B. Geschlecht, Tumorstadium, Tumorlokalisation, Grading und Resektionsart.

Zur Darstellung und Berechnung der Korrelationen zwischen den Proteinexpressionen und dem Gesamtüberleben, wurde das multivariate Cox-Regression-Modell genutzt. Damit sollte die prognostische Signifikanz und die Unabhängigkeit des Parameters Gesamtüberleben ermittelt werden. Adjustiert wurde die multivariate Analyse nach dem Tumorstadium, der Tumorlokalisation und der Resektionsart. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Alters-und Geschlechterverteilung, Überleben

Insgesamt wurden 50 Sarkome untersucht. Davon waren 26 (52%) Synovial- und 24 (48%) Leiomyosarkome. Es waren 21 (42%) männliche und 29 (58%) weibliche Patienten. Der Median bezogen auf das Diagnosealter (Erstdiagnose) ergab für alle Sarkome zusammengefasst 55 Jahre, der Mean lag bei 47,8 Jahren. Bei den Synovialsarkomen ergab sich ein Median von 30,5 Jahren und ein Mean von 33,4. Für die Leiomyosarkome lag der Median bei 63,0 und der Mean bei 63,4 Jahren. Insgesamt waren 32 (64%) Patienten im Erhebungszeitraum (1979-2005) verstorben, 18 (36%) Patienten lebten noch zum Zeitpunkt der Berechnungen. Bei beiden Entitäten gab es keine Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht Alter, Geschlecht und Überleben (Anzahl in %, Alter in Jahren)

	Anzahl n	Diagnosealter in Jahren		Geschlechterverteilung		Überleben	
		mean	median	männlich	weiblich	lebt	verstorben
Synovialsarkome	26(52%)	33,38	30,5	11(42,3%)	15(57,7%)	9(34,6%)	17(65,4%)
Leiomyosarkome	24(48%)	63,42	63,0	10(41,7%)	14(58,3%)	9(37,5%)	15(62,5%)
Gesamt	50(100%)	47,8	55	21(42%)	29(58%)	18(36%)	32(64%)

4.2 Tumorgrad, Tumorstadium, Tumorlokalisation und Resektionsgrad

Klinische Daten für Tumorgrad, Tumorstadium, Tumorlokalisation und Resektionsgrad konnten für alle 50 Fälle erfasst werden. Die Häufigkeiten und Verteilungen sind entsprechend in der Tabelle 14 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 14: Häufigkeiten der klinischen Prognose-Parameter (Anzahl/Prozent)

	Synovial- sarkome	Leiomyo- sarkome	Gesamt
Tumorgrad			
Grad I	2 (7,7%)	3 (12,5%)	5 (10%)
Grad II	13 (50%)	8 (33,3%)	21 (42%)
Grad III	11 (42,3%)	13 (54,2%)	24 (48%)
Tumorstadium			
Stadium I	2 (7,7%)	3 (12,5%)	5 (10%)
Stadium II	15 (57,7%)	7 (29,2%)	22 (44%)
Stadium III	6 (23,1%)	11 (45,8%)	17 (34%)
Stadium IV	3 (11,5%)	3 (12,5%)	6 (12%)
Tumorlokalisation			
Extremitäten	21 (80,8%)	12 (50%)	33 (66%)
Bauchwand	2 (7,7%)	1 (4,2%)	3 (6%)
Kopf/Hals	2 (7,7%)	0	2 (4%)
Abdomen/Retroperitoneum	1 (3,8%)	11 (45,8%)	12 (24%)
Resektionsgrad			
Komplette Exzision (R0)	23 (88,5%)	15 (62,5%)	38 (76%)
Inkomplette Exzision (R1/2)	3 (11,5%)	9 (37,5%)	12 (24%)

Tumorgrad

Insgesamt wurden 5 Sarkome (10%) mit Grad I (niedriggradig), 21 Sarkome (42%) mit Grad II (mittelgradig) und 24 Sarkome (48%) mit Grad III (hochgradig) nach van Unnik et al. bewertet (siehe Abb. 6).

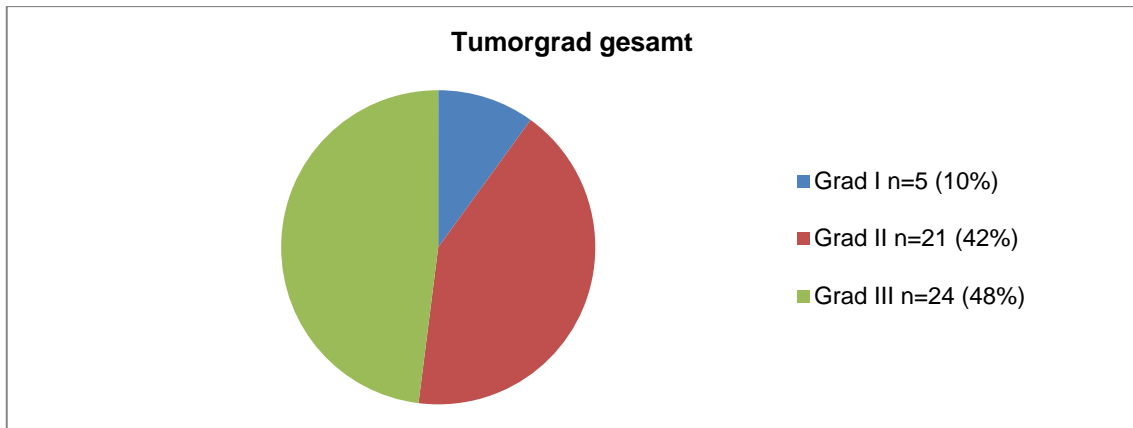


Abbildung 6: Gesamtverteilung Tumorgrad

Für die Synovial- und Leiomyosarkome ergaben sich folgende Verteilungen:

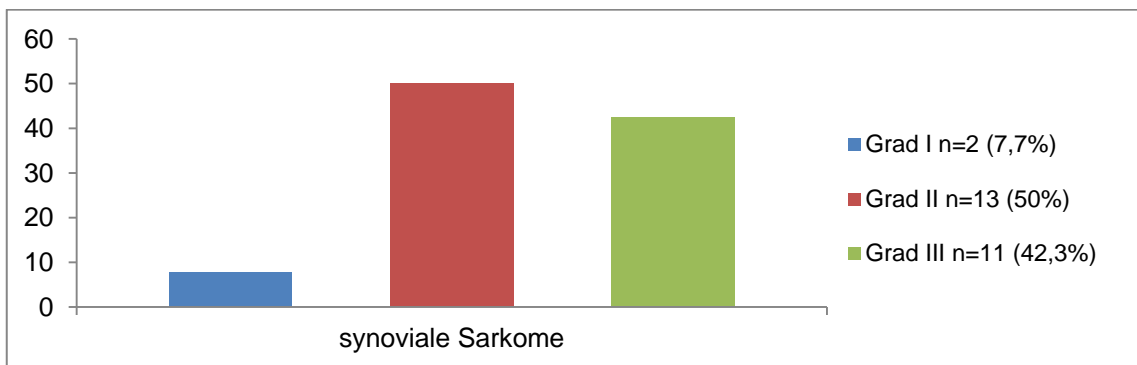


Abbildung 7: Verteilung Tumorgrad - Synovialsarkome

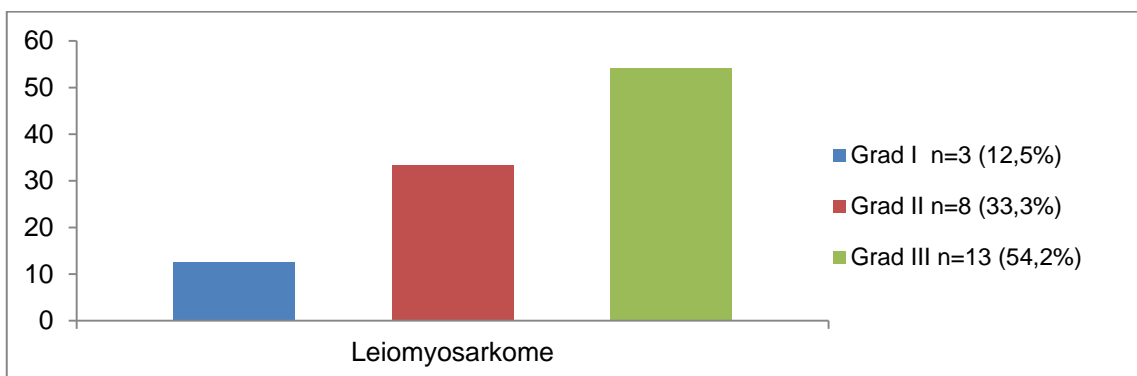


Abbildung 8: Verteilung Tumorgrad – Leiomyosarkome

Tumorstadium

Bezüglich der Gesamtverteilung ergaben sich im Stadium I 5 Fälle (10%), Stadium II 22 Fälle (44%), Stadium III 17 Fälle (34%) und im Stadium IV 6 Fälle (12%). Eine unterschiedliche Verteilung in beiden Tumorgruppen trat vor allem in Stadium II und III auf. So wiesen von den Synovialsarkomen 15 (57,7%) das Stadium II und 6 (23,1%) das Stadium III auf. Bei den Leiomyosarkomen wiesen 7 (29,2%) das Stadium II und 11 (45,8%) das Stadium III auf. Eine mögliche Erklärung für diese Umkehr, war die unterschiedliche Verteilung der Lokalisation beider Entitäten. Die im Bereich des Retroperitoneums häufiger auftretenden Leiomyosarkome werden wahrscheinlich später diagnostiziert woraus sich ein fortgeschrittenes Stadium ergeben könnte.

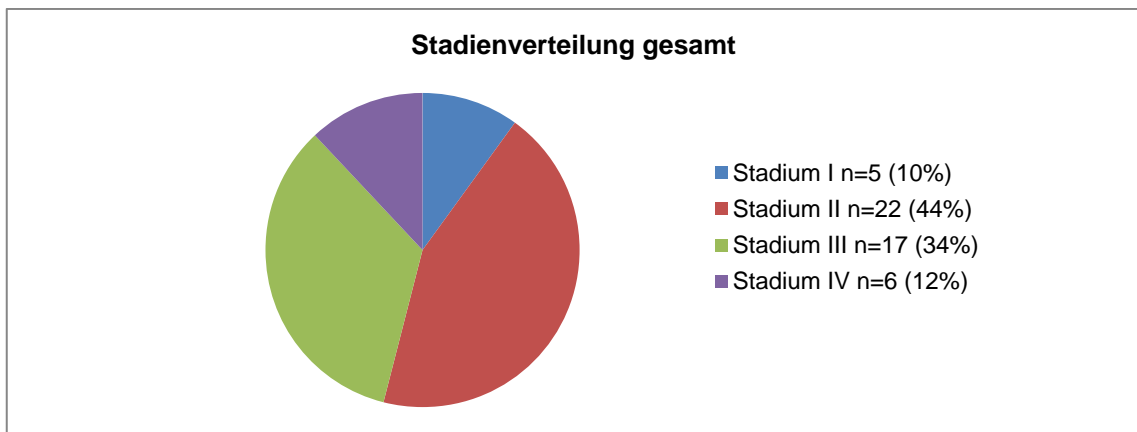


Abbildung 9: Gesamtverteilung der Stadien

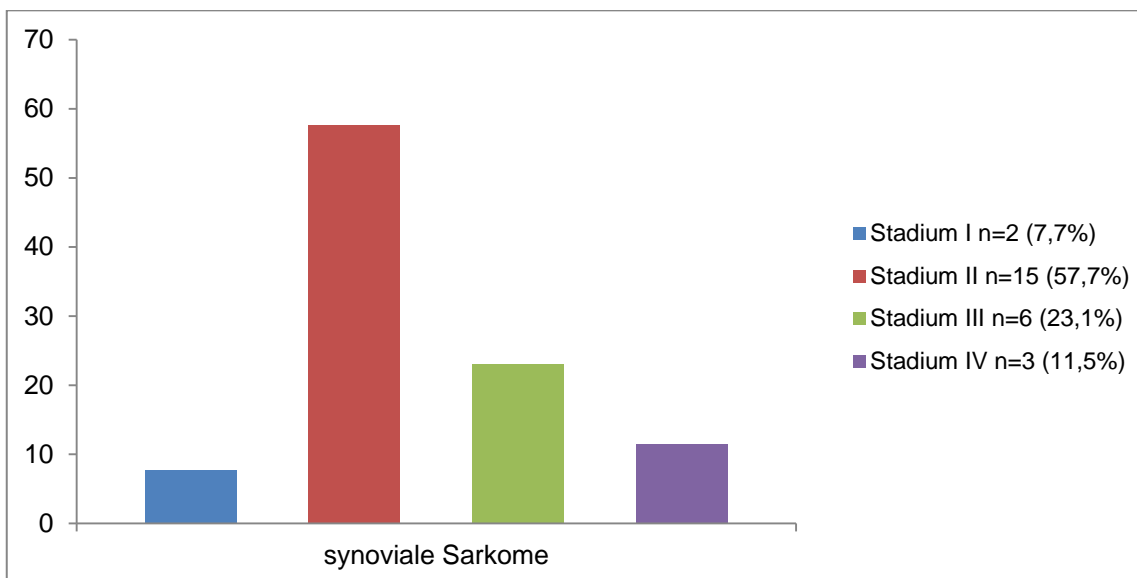


Abbildung 10: Stadienverteilung – Synovialsarkome

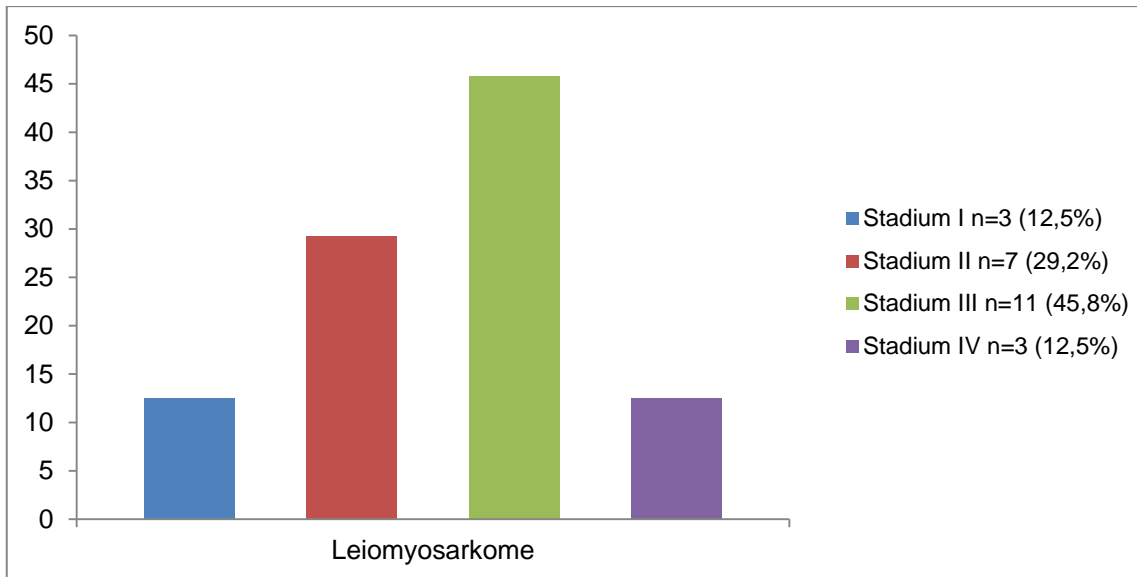


Abbildung 11: Stadienverteilung – Leiomyosarkome

Tumorklassifikation

Anhand der erfassten klinischen Daten zeigte sich, dass die Extremitäten mit 33 Fällen (66%) als häufigste Lokalisation, gefolgt vom Abdomen/Retroperitoneum mit 12 Fällen (24%) auftraten. Am Körperstamm wurden 3 Fälle (6%) und im Bereich des Kopf/Halses 2 Fälle (4%) eruiert (siehe Abb. 12). In Bezug auf die einzelnen Entitäten ergaben sich wie erwartet unterschiedliche Verteilungen. So war bei den Synovialsarkomen die Extremität die führende Lokalisation mit 21 Fällen (80,8%). Bei den Leiomyosarkomen waren sowohl die Extremitäten mit 12 Fällen (50%), als auch das Abdomen/Retroperitoneum mit 11 Fällen (45,8%) die Hauptlokalisationen (siehe Abb. 13 u. 14).

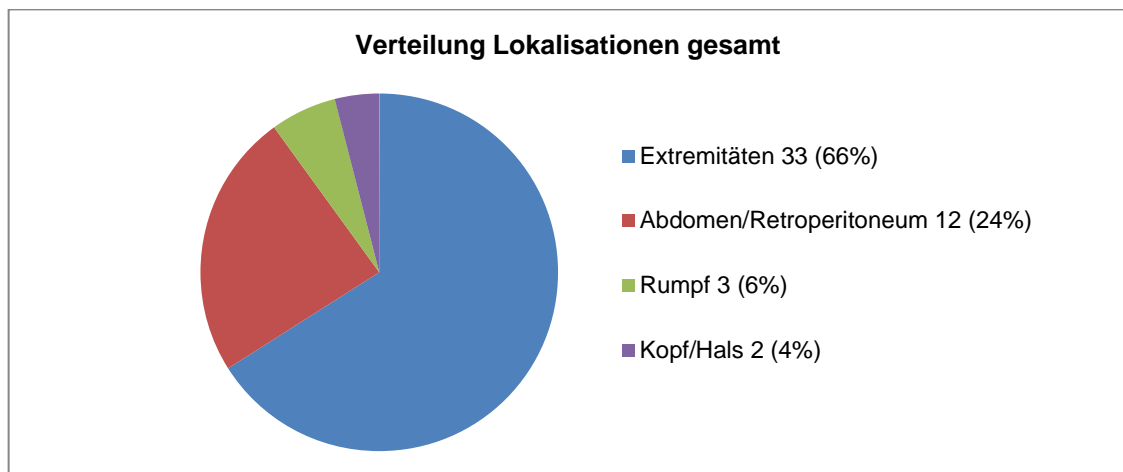


Abbildung 12: Gesamtverteilung der Lokalisationen

Ergebnisse

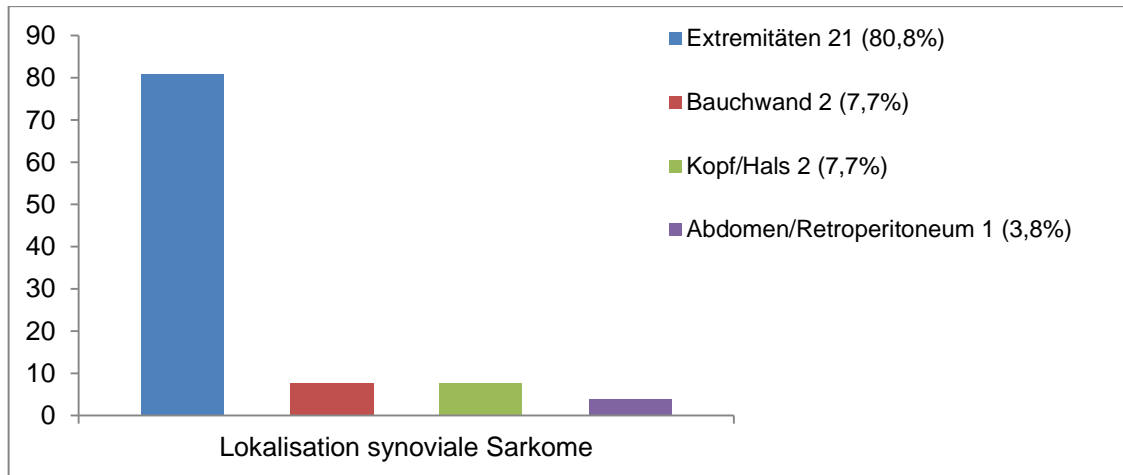


Abbildung 13: Verteilung Lokalisation – Synovialsarkome

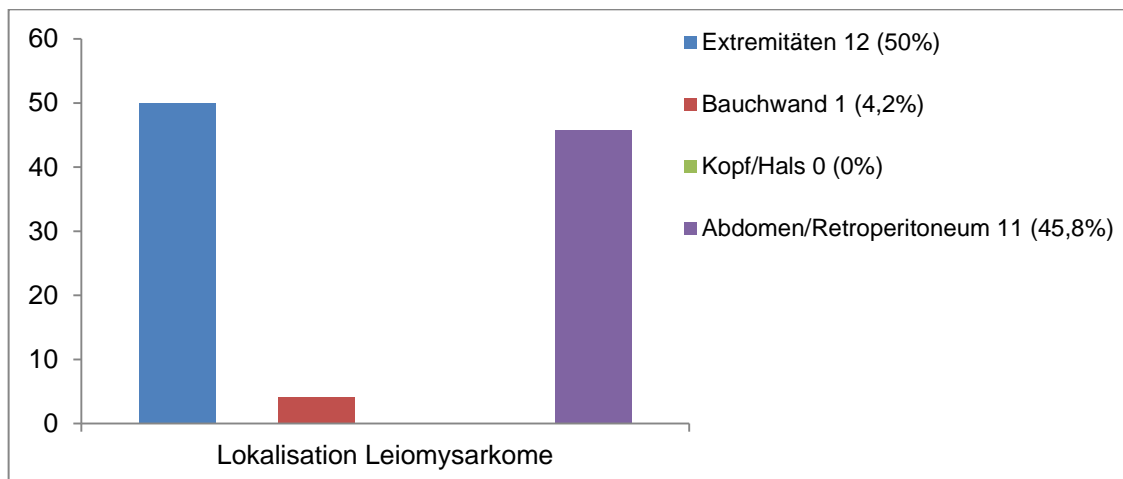


Abbildung 14: Verteilung Lokalisation – Leiomyosarkome

Resektionsgrad

Von den 50 Tumoren konnten 38 (76%) vollständig exzidiert werden (R0). 12 (24%) Tumoren wiesen einen mikroskopischen bzw. makroskopischen Tumorrest auf (R1 bzw. R2). Die Verteilung auf beide Tumorgruppen zeigte sich heterogen. So konnten 23 (88,5%) der Synovialsarkome vollständig im Gesunden entfernt werden. Bei den Leiomyosarkomen wurden 15 (62,5%) komplett exzidiert. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied, war das differente Lokalisationsmuster beider Entitäten und die damit einhergehende eingeschränkte Resektabilität der Tumoren im Bereich des Abdomens bzw. Retroperitoneums.

Ergebnisse

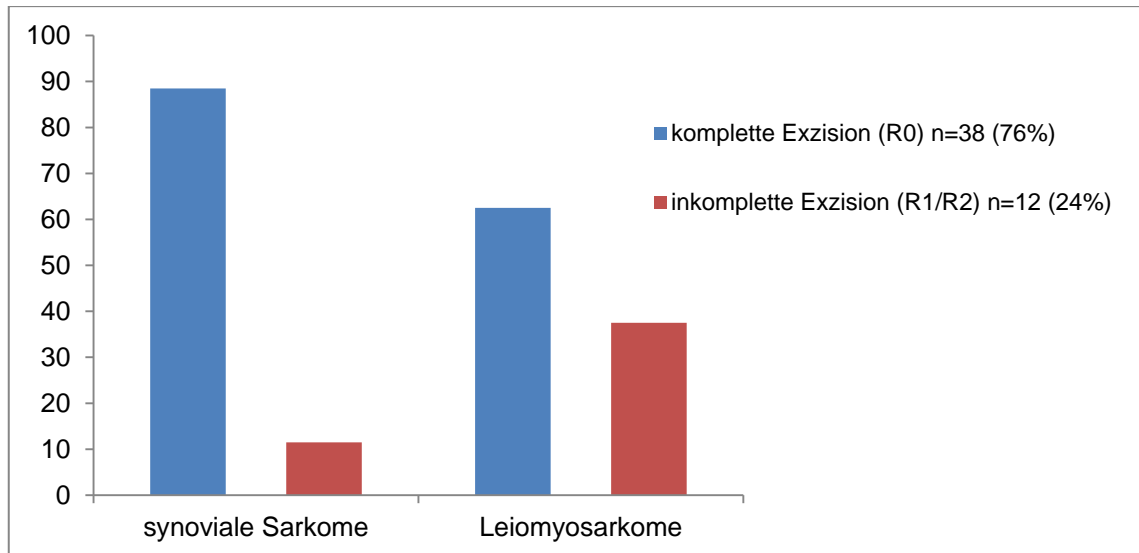


Abbildung 15: Verteilung komplette/inkomplette Exzision

4.3 Auswertung der Survivin Proteinexpression

Tabelle 15: Verteilung der Immunhistochemischen Nachweise für Survivin im Zytoplasma und im Kern

IRS-Werte Survivin Zytoplasma (4 Gruppen)	Synovialsarkome	Leiomyosarkome	Gesamt
negativ 0-2	4	4	8
schwach 3-4	6	9	15
moderat 6-8	9	10	19
stark 9-12	7	1	8
	26	24	50
IRS-Werte Survivin Kern (3 Gruppen)	Synovialsarkome	Leiomyosarkome	Gesamt
negativ 0-2	17	12	29
schwach 3-4	2	8	10
moderat 6-8	7	4	11
	26	24	50

Die zytoplasmatische Survivinexpression (IRS) der Synovialsarkome (n=26) zeigte sich negativ in 4, schwach in 6, moderat in 9 und stark in 7 Fällen bzw. negativ in 17, schwach in 2 und moderat in 7 Fällen hinsichtlich der nukleären Expression (IRS). Bei den Leiomyosarkomen (n=24) ließen sich bezüglich der zytoplasmatischen Expression 4 negative, 9 schwache, 10 moderate Fälle und 1 starker Fall detektieren. Die nukleäre Expression ergab 12 negative, 8 schwache und 4 moderate Fälle. Bei beiden Entitäten zeigten sich keine stark positiven Befunde (IRS 9-12) für Kernfärbungen.

Trotz der höheren Anzahl für IRS 9-12 im Zytoplasma bei den Synovialsarkomen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Survivinexpression in beiden Tumorgruppen, so dass zur Erweiterung der statistischen Auswertung die Entitäten zusammengefasst werden konnten. Die Einteilung erfolgte zuvor in 4 Gruppen (Zytoplasma), respektive 3 Gruppen (Kern) für die Berechnungen (siehe Tabelle 15).

Mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, Tumorlokalisation und Resektionsgrad) zeigte sich für die Survivinexpression sowohl im Zytoplasma als auch im Kern eine statistisch signifikante Korrelation zur Prognose von Synovial- und Leiomyosarkompatienten.

Patienten mit einer moderaten Expression im Zytoplasma hatten ein 5,7-fach erhöhtes Risiko ($p = 0,004$) am Tumorleiden zu versterben, im Vergleich zu Patienten deren Tumoren eine schwache zytoplasmatische Färbung aufwiesen (siehe Abbildung 16).

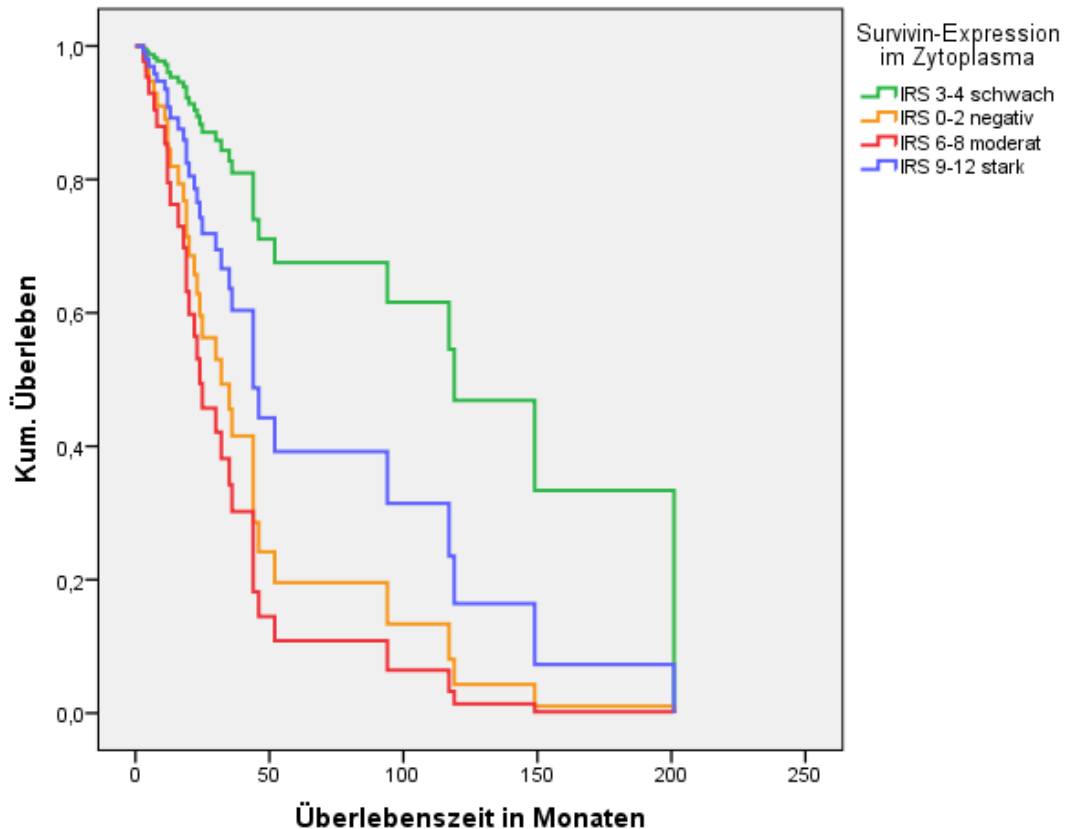


Abbildung 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – Svv-Expression im Zytoplasma

Tabelle 16: Svv-Expression im Zytoplasma (n=50)– Signifikanz und relatives Risiko

Svv im Zytoplasma	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
Svv IRS 3-4 schwach Zytoplasma	Referenz	1		
Svv IRS 0-2 negativ Zytoplasma	0,055	4,155	0,967	17,853
Svv IRS 6-8 moderat Zytoplasma	0,004	5,661	1,723	18,595
Svv IRS 9-12 stark Zytoplasma	0,241	2,386	0,558	10,213

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für Patienten, deren Tumoren eine moderate Färbung der Kerne aufwiesen gegenüber den Patienten mit einer schwachen Kernfärbung. Das Risiko am Tumorleiden zu versterben, war für Patienten deren Tumoren die moderate Survivinexpression zeigten ebenfalls signifikant um das 5,7-fache erhöht ($p = 0,022$, siehe Abbildung 17).

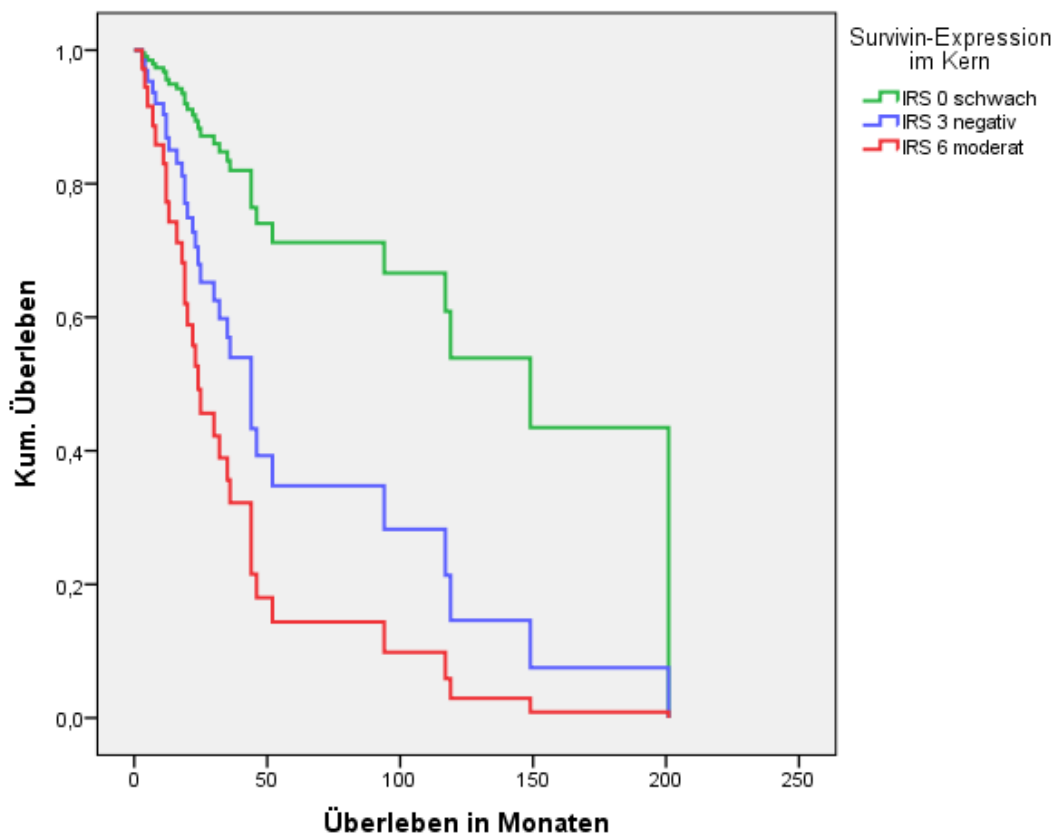


Abbildung 17: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – Svv-Expression im Kern

Tabelle 17: Svv-Expression im Kern, gesamte Fälle (n=50) – Signifikanz und relatives Risiko

Svv im Kern	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
Svv IRS 3-4 schwach Kern	Referenz	1		
Svv IRS 0-2 negativ Kern	0,110	3,109	0,774	12,488
Svv IRS 6-8 moderat Kern	0,022	5,705	1,289	25,257

Als nächstes überprüften wir die Möglichkeit eines additiven Effektes der moderaten gegenüber der schwachen Survivinexpression im Zytoplasma und im Kern bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten. Hierzu wurden die Patienten in 3 Gruppen eingeteilt. In Gruppe 1 wurden die Patienten (n=6) eingeschlossen, deren Tumoren eine schwache Färbung in beiden Kompartimenten aufwiesen (Zytoplasma/Kern IRS 3-4). In Gruppe 2 waren alle Patienten mit den restlichen Färbungen (n=35). In Gruppe 3 wurden die Patienten (n=9) eingeschlossen, deren Tumoren eine moderate/starke Survivinexpression im Zytoplasma (IRS ≥ 6) und eine moderate Färbung im Kern (IRS ≥ 6) hatten.

Als signifikantes Ergebnis zeigte sich bei den Patienten der Gruppe 3 (moderate/starke Expression im Zytoplasma, moderate Expression im Kern, IRS ≥ 6) ein deutlich erhöhtes Risiko am Tumorleiden zu versterben (24,8-fach, $p = 0,003$) gegenüber der Gruppe 1 mit einer schwachen Expression im Zytoplasma und im Kern (siehe Abbildung 18, Tabelle 18). In der Kaplan-Meier Analyse ergab sich für Gruppe 3 ein durchschnittliches Überleben von 29 Monaten gegenüber der Gruppe 1, mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 73 Monaten ($p = 0,17$). Dieses Ergebnis war aufgrund der geringen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen aber nicht signifikant.

Weiterhin ergab sich ein 9,4-faches Risiko ($p = 0,024$) für Patienten der Gruppe 2 gegenüber der Referenzgruppe 1. Die Gruppe 2 schloss die restlichen Patienten ein, bei denen eine Expression in nur einem der beiden Kompartimente mit IRS ≥ 6 oder IRS = 3-4 auftrat.

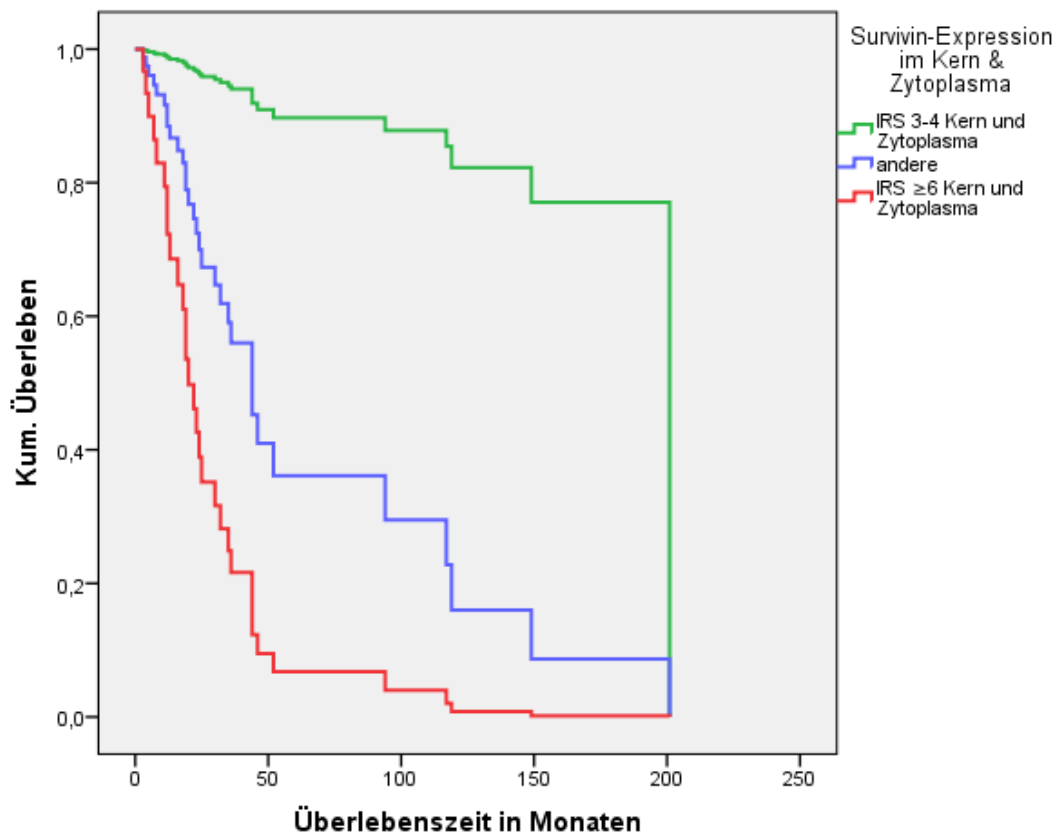


Abbildung 18: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – Svv-Expression im Kern und Zytoplasma (n=50)

Tabelle 18: Svv-Expression im Kern und Zytoplasma (n=50) – Signifikanz und relatives Risiko

Svv-Expression im Kern und Zytoplasma	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
Svv IRS 3-4 Kern und Zytoplasma	Referenz	1		
Svv andere	0,024	9,384	1,340	65,735
Svv IRS ≥ 6 Kern und Zytoplasma	0,003	24,779	2,924	209,996

4.4 Auswertung der Carboanhydrase 9 Proteinexpression

Tabelle 19: Immunhistochemische Verteilung für CA9

modifizierte IRS-Werte CA9 Zytoplasma/membranär	Synovialsarkome	Leiomyosarkome	Gesamt
negativ 0	10	3	13
schwach 1-3	8	7	15
moderat/stark 4-12	8	14	22
	26	24	50

Von den 50 Gesamtfällen ergaben sich 13 negative, 15 schwache und 22 moderat/stark positive CA9-Expressionsmuster. Davon waren bei den Synovialsarkomen 10 Fälle negativ, 8 schwach positiv und 8 moderat/stark positiv. Unter den Leiomyosarkomen waren 3 Fälle negativ, 7 schwach positiv und 14 Fälle moderat/stark positiv.

Die Einteilung erfolgte in 3 Gruppen (Einteilung nach der 33% und 66% - Perzentile in Tertilen). Die 1. Gruppe schloss die Fälle IRS = 0 (negativ) ein. In der 2. Gruppe wurden alle Fälle mit IRS = 1-3 (schwach) inkludiert. In der 3. Gruppe befanden sich die restlichen Fälle (IRS = 4-12, moderat/stark).

Die primäre Auswertung erfolgte unter Einbeziehung aller Fälle (n = 50), da auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Färbungen zwischen beiden Tumorgruppen bestanden. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, Tumorlokalisation und Resektionsgrad) ließen sich jedoch keine statistisch signifikanten Ergebnisse hinsichtlich des tumorbedingten Überlebens nachweisen (siehe Abbildung 19, Tabelle 20). Aus diesem Grund, erfolgte unter Beibehaltung der Gruppeneinteilung die Berechnung für die Entitäten einzeln.

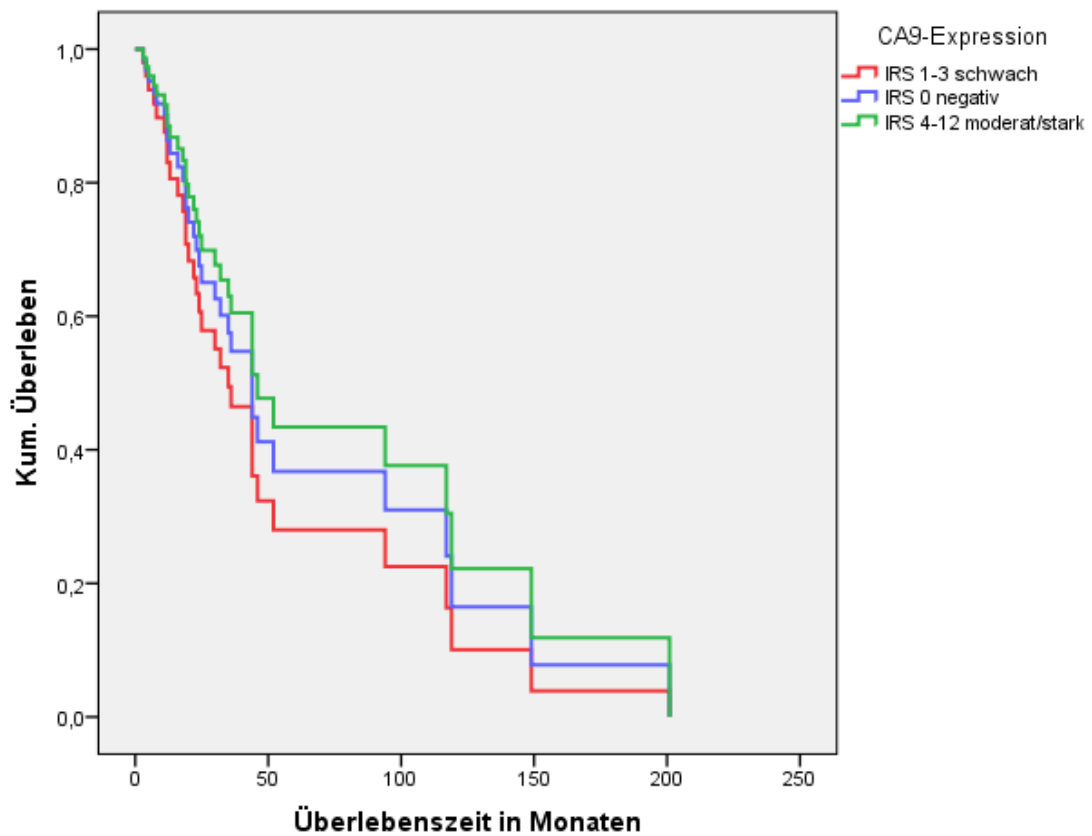


Abbildung 19: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – CA9 gesamte Fälle (n=50)

Tabelle 20: CA9-Expression gesamte Fälle (n=50) – Signifikanz und relatives Risiko

CA9-Expression gesamte Fälle	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
CA9 IRS 4-12 moderat/stark	Referenz	1		
CA9 IRS 0 negativ	0,337	1,526	0,645	3,611
CA9 IRS 1-3 schwach	0,795	1,199	0,304	4,724

Die multivariate Analyse für die Synovialsarkome (n = 26) erbrachte einen deutlichen Nachteil für die Gruppe 2 (IRS 1-3) gegenüber der Referenzgruppe 1 (IRS 0). Das Risiko am Tumor zu versterben, war für die Gruppe 2 um das 12,7fache (p=0,025) signifikant erhöht (siehe Abbildung 20, Tabelle 21). Patienten der Referenzgruppe, bei der die Tumoren im Prinzip keinerlei Expression von CA9 aufwiesen, hatten die beste Prognose bezüglich des Überlebens.

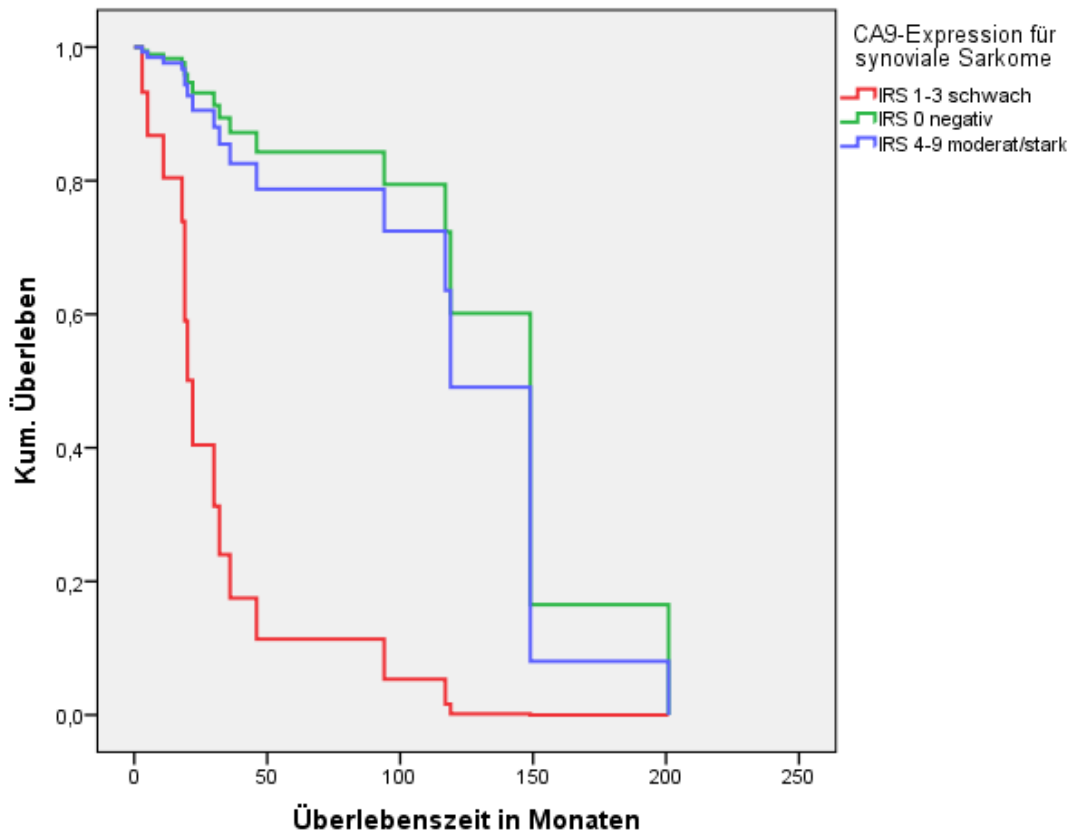


Abbildung 20: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – CA9, Synovialsarkome (n=26)

Tabelle 21: CA9-Expression – Synovialsarkome (n=26), Signifikanz und relatives Risiko

CA9-Expression Synovialsarkome	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
CA9 IRS 0 negativ	Referenz	1		
CA9 IRS 1-3 schwach	0,025	12,73	1,383	117,218
CA9 IRS 4-9 moderat/stark	0,762	1,400	0,159	12,308

Die Analyse für die Leiomyosarkome (n = 24) bot ein ganz anderes Ergebnis. Für diese Entität zeigten sich die Überlebensdaten anders assoziiert. Die beste Prognose hatte die Gruppe 2 (IRS 1-3) und die schlechteste Prognose hatte die Gruppe 1 (IRS 0) mit einem relativen Risiko von 3,3 (p = 0,43). Es ergab sich hierfür, wie auch schon bei den Gesamtfällen, keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 21, Tabelle 22).

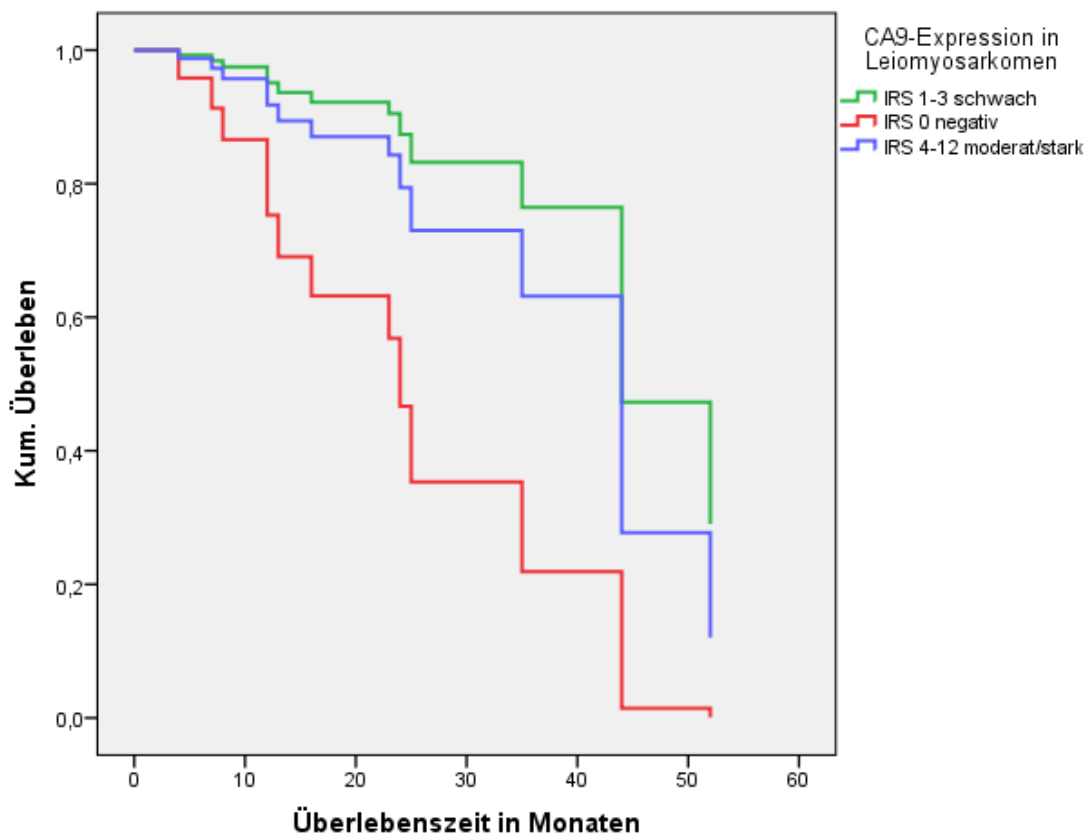


Abbildung 21: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – CA9, Leiomyosarkome (n=24)

Tabelle 22: CA9-Expression – Leiomyosarkome (n=24), Signifikanz und relatives Risiko

CA9-Expression Leiomyosarkome	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
CA9 IRS 1-3 schwach	Referenz	1		
CA9 IRS 4-12 moderat/stark	0,431	0,584	0,153	2,228
CA9 IRS 0 negativ	0,432	3,304	0,168	64,938

4.5 Auswertung der Osteopontin Proteinexpression

Tabelle 23: Immunhistochemische Verteilung im Zytoplasma für Osteopontin

Modifizierte IRS-Werte OPN Zytoplasma	Synovialsarkome	Leiomyosarkome	Gesamt
Negativ 0	14	12	26
Schwach 1-3	8	4	12
Moderat/stark 4-12	4	7	11
	26	23	49

Die Auswertungen für Osteopontin konnten nur für insgesamt 49 Fälle durchgeführt werden, da ein Fall nicht auswertbar war. Insgesamt ergaben sich für die zytoplasmatischen OPN Färbungen 26 negative, 12 schwache und 11 moderat/starke Fälle. Die Synovialsarkome wiesen davon 14 negative, 8 schwache und 4 moderat/starke Färbungen auf. Unter den Leiomyosarkomen ergaben sich 12 negative und 4 schwache Färbungen sowie 7 moderat/starke Färbung. Wie auch bei den anderen Antikörperreaktionen für Survivin und CA 9, zeigten sich unter den Färbungen keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster beider Entitäten, so dass die Fälle zunächst als Gesamtheit betrachtet wurden. Es wurden, wie für die CA 9 – Auswertungen, 3 Gruppen gebildet. Auch hier erfolgte im Rahmen der Vergleichbarkeit der Gruppen die Modifikation des IRS Systems. Gruppe 1 beinhaltete alle negativen Fälle mit IRS = 0. In der Gruppe 2 wurden alle Fälle mit IRS 1-3 (schwach) eingeschlossen. Gruppe 3 schloss die restlichen Fälle also IRS 4-12 (moderat/stark) ein. Die Einteilung erfolgte nach der 33%- und 66% - Perzentile (Tertilen).

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (ebenfalls adjustiert nach Tumorstadium, Tumorlokalisation und Resektionsgrad) ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse, wobei sich in der Grafik die Gruppe 1 (IRS = 0) mit der schlechtesten Prognose darstellte (siehe Abbildung 21). Wie auch bei den vorherigen Auswertungen, wurden die Berechnungen für die einzelnen Entitäten fortgeführt.

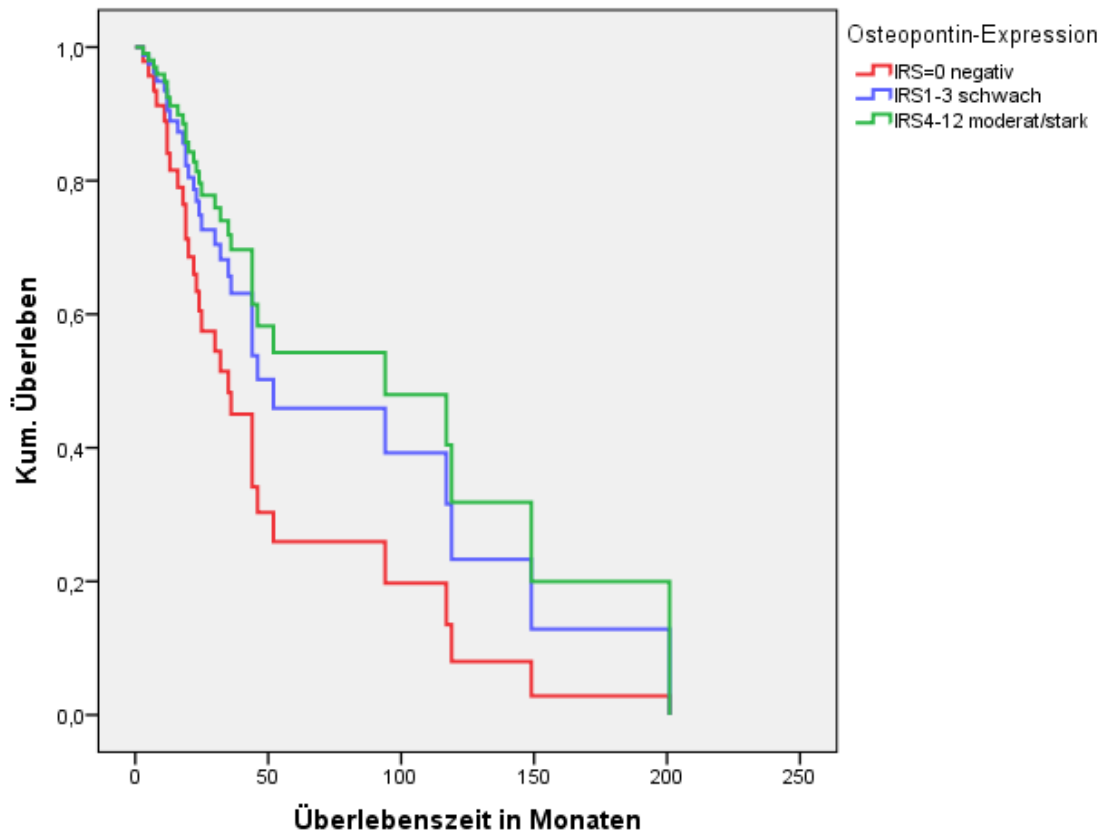


Abbildung 22: Multivariate Cox-Regressionsanalyse – OPN gesamte Fälle (n=49)

Tabelle 24: OPN-Expression – gesamte Fälle (n=49), Signifikanz und relatives Risiko

OPN-Expression gesamte Fälle	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
OPN IRS 4-12 moderat/stark	Referenz	1		
OPN IRS 0 negativ	0,212	2,207	0,636	7,653
OPN IRS 1-3 schwach	0,738	1,273	0,309	5,243

In der multivariaten Analyse für die Synovialsarkome (n=26) ergab sich ebenfalls die schlechteste Prognose für die Gruppe 1 (IRS = 0). Diesmal jedoch mit einem signifikanten Ergebnis in Bezug zur Gruppe 2 (IRS 1-3). Es lag ein 5,8-fach erhöhtes Risiko (p = 0,034), am Tumorleiden zu versterben, vor.

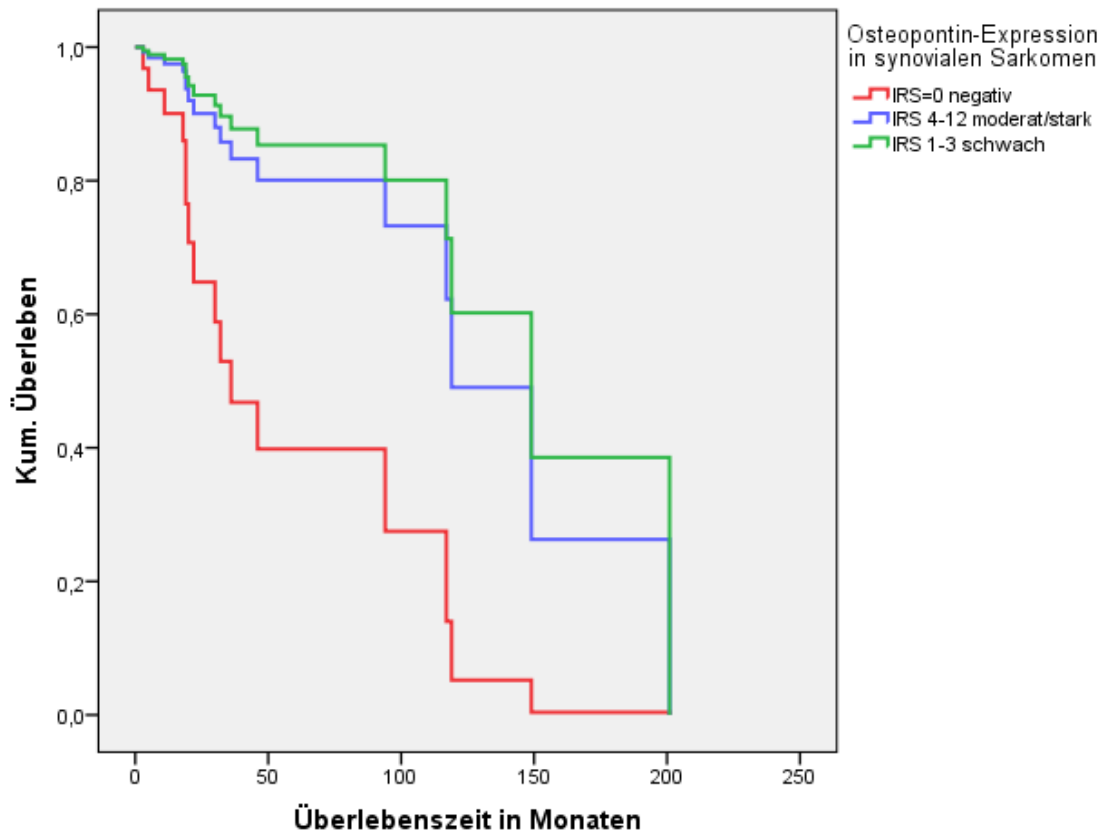


Abbildung 23: Multivariate Cox-Regressionsanalyse –OPN Synovialsarkome (n=26)

Tabelle 25: OPN-Expression – Synovialsarkome (n=26), Signifikanz und relatives Risiko

OPN-Expression Synovialsarkome	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
OPN IRS 1-3 schwach	Referenz	1		
OPN IRS 0 negativ	0,034	5,814	1,144	29,541
OPN IRS 4-12 moderat/stark	0,802	1,403	0,100	19,765

Ähnlich wie bei der Auswertung der CA9 Fälle ergab sich für die Leiomyosarkome (n=23), wenn auch nicht signifikant, ein ganz anderes Ergebnis als für die Synovialsarkome. Die Gruppe 3 (IRS 4-12) wies ein 5,1-fach erhöhtes Risiko (p=0,144) hinsichtlich des Überlebens in Bezug zur Referenzgruppe 1 (IRS = 0) auf, welches aber nicht signifikant war.

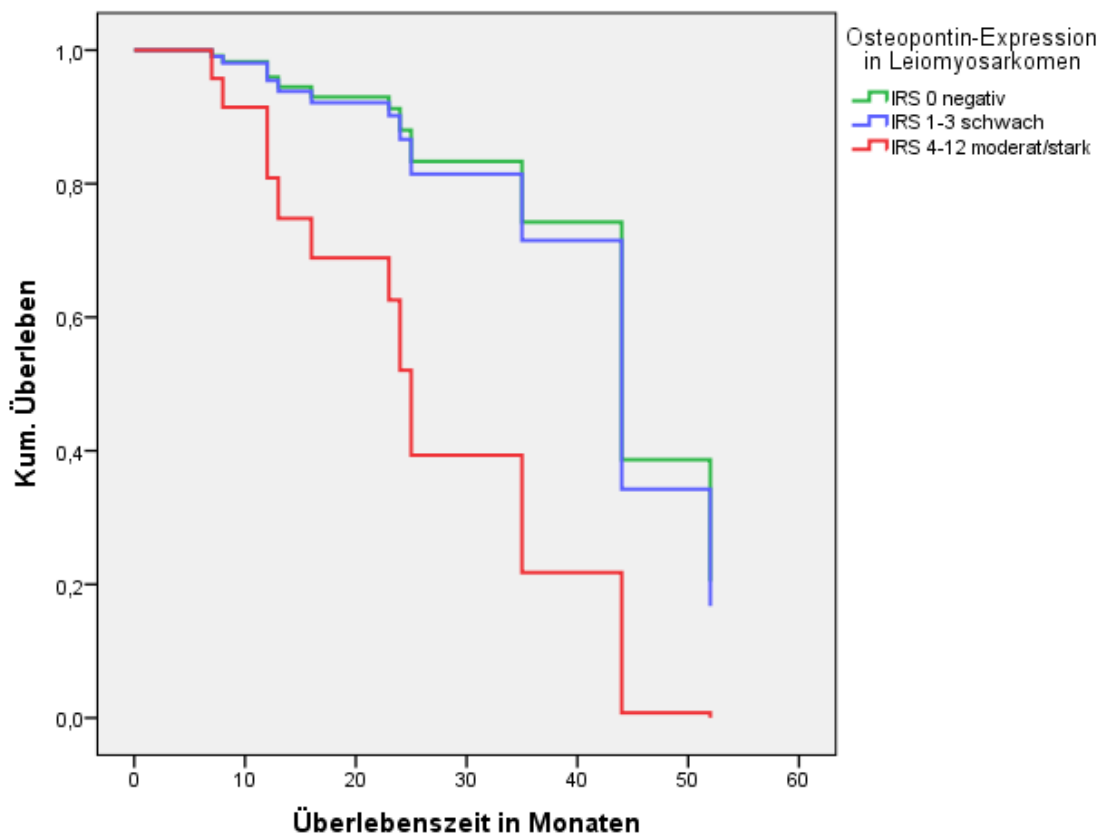


Abbildung 24: Multivariate Cox-Regressionsanalyse–OPN Leiomyosarkome (n=23)

Tabelle 26: OPN-Expression –Leiomyosarkome (n=23), Signifikanz und relatives Risiko

OPN-Expression Leiomyosarkome	Signifikanz	RR	95,0% Konfidenzinterv. für RR	
			Untere	Obere
OPN IRS 0 negativ	Referenz	1		
OPN IRS 4-12 moderat/stark	0,900	1,127	0,176	7,237
OPN IRS 1-3 schwach	0,144	5,121	0,574	45,717

5. Diskussion

5.1 Survivin - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen

Das 1997 entdeckte Protein Survivin gehört zur Familie der *Inhibitor-of-Apoptosis*-Proteine und stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen der Zellteilung und der Apoptose dar [58]. Es wird von einigen normalen differenzierten Geweben exprimiert und wird in vielen Tumorarten, als tumor – assoziiertes Genprodukt, überexprimiert [58, 73, 165]. Wir untersuchten immunhistochemisch die Expression von Survivin in beiden Kompartimenten (Zytoplasma und Kern). Nach quantitativer Erfassung mittels dem IRS, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression in beiden Sarkomentitäten, so dass wir diese zusammengefasst auswerteten (n = 50). Gegenüber einer schwachen Survivinexpression, korrelierte in der multivariaten Analyse eine moderate Survivinexpression, sowohl im Zytoplasma als auch im Kern, mit der schlechtesten Prognose für die Patienten ($RR^{\text{Zyto/Kern}}=5,7$; $p^{\text{Zyto}}=0,004$; $p^{\text{Kern}}=0,022$). Die Kombination der Expressionen in beiden Kompartimenten zeigte einen additiven Effekt hinsichtlich des Risikos und ergab ebenfalls die schlechteste Prognose für die Patienten ($RR^{\text{Zyto+Kern}} = 24,8$; $p^{\text{Zyto+Kern}} = 0,003$). Auch die negative Expression von Survivin im Zytoplasma und im Kern zeigte eine Assoziation zum Überleben in Bezug zur schwachen Expression, wenn auch nicht signifikant ($RR^{\text{Zyto}}=4,2$; $p=0,055$; $RR^{\text{Kern}}=3,1$; $p=0,11$). Somit konnten wir Survivin als unabhängigen prognostischen Marker bestätigen. Kappler et al. konnten Survivin auf RNA (qRT-PCR) – und Proteinebene (ELISA-Test und Westernhybridisierung) in einer multivariaten Analyse ebenfalls als unabhängigen Prognosemarker in Weichteilsarkomen (verschiedene Entitäten) identifizieren. Hier wiesen die Patienten mit einer erhöhten Survivinexpression ein bis zu 19,8 -fach erhöhtes Risiko bezüglich des tumorbedingten Versterbens auf, was durch unsere immunhistochemischen Ergebnisse unterstützt wird [81]. Aber auch in anderen Tumoren, wie z.B. dem Magenkarzinom [102], dem kolorektalen Karzinom [76], dem hepatozellulären Karzinom [166] und dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [78] konnten Korrelationen zwischen der Überexpression von Survivin und einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Überleben festgestellt werden. Insgesamt gibt es jedoch bisher nur wenige Publikationen, welche die Survivinexpression in Sarkomen mittels Immunhistochemie untersucht haben. In einer Studie von Demir et al. wurden 65 Synovialsarkome immunhistochemisch ausgewertet, wobei sich keine signifikante Korrelation zwischen der Überexpression und der Prognose ergab [167]. Hingorani et

al. konnten in Ewing Sarkomen, Survivin immunhistochemisch detektieren und eine Korrelation zur Prognose mit einem Risiko von 6,05 ($p=0,04$) aufzeigen [168]. Caldas et al. wiesen eine Überexpression von Survivin in über 80% von untersuchten Rhabdomyosarkomen nach, es ließ sich jedoch keine statistisch signifikante Aussage zur Prognose herleiten [169]. Auch in Osteosarkomen wurde Survivin immunhistochemisch untersucht. In der Untersuchung von Trieb et al. konnte eine nukleäre Expression mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert werden. Die zytoplasmatische Expression ergab keine Korrelation [170]. Somit könnte Survivin auch als positiv prognostischer Marker fungieren. Diese gegensätzlichen Aussagen zeigen auf, wie komplex Survivin auf molekularer Ebene involviert ist. In Bezug zu unseren Ergebnissen zeigte sich in den beiden Entitäten sogar ein additiver Effekt für die subzellulären Kompartimente bezüglich der negativen Prognose für die Patienten. Eine Möglichkeit diesen Effekt theoretisch zu erklären, ist die Funktionsweise von Survivin im Zytoplasma und der Verbindung zwischen Zellteilung und Apoptose (Kern, Zytoplasma). So entfaltet Survivin seine antiapoptotische Wirkung auch während der Zellteilung, indem es durch den *maturation-promoting factor* stabilisiert wird und so gleichzeitig den Zelltod während der Mitose unterdrückt [87]. Zudem könnten additiv verstärkend die zytoplasmatisch antiapoptotischen Signalwege gesteuert werden und würden dementsprechend unsere Ergebnisse stützen. Li et al. postulieren, dass eine Survivinexpression im Zytoplasma fördernd auf das Zellüberleben (antiapoptotisch) wirkt, währenddessen eine Expression im Kern die Zellproliferation fördert [171]. Dabei handelt es sich aber nicht um einen quantitativen Effekt, da eine starke zytoplasmatische Färbung nicht mit der schlechtesten Prognose assoziiert ist. Es scheint sich eher um ein fein ausbalanciertes System zu handeln, welches gewebspezifisch wirkt. Anhand unserer Ergebnisse könnte man Survivin ein Funktionsoptimum im moderaten Färbereich unterstellen.

Ein weiterer Aspekt, welcher hinsichtlich der Ergebnisse nicht zu vernachlässigen ist, ist die Anwendung des Scoring – Systems. Wir verwendeten den immunoreaktiven Score nach Remmele und Stegner, welcher von der negativen bis hin zur starken Färbung unterscheidet und es ermöglicht, abgestuft zwischen den verschiedenen Färbeanteilen und Färbeintensitäten zu differenzieren. Andere Untersuchungen wie z.B. von Demir et al. unterschieden zwischen negativen und positiven Färbungen in den Synovialsarkomen [167]. Hingorani et al. beschrieben in Ewing Sarkomen eine Überexpression ab 50% Färbeanteil und verglichen diese mit einem Färbeanteil weniger 50%. [168]. Somit sind die Aussagen und Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen schwer vergleichbar, da sich aus den

verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten unterschiedliche Einteilungen ergeben und es zu subjektiv unterschiedlichen Interpretationen kommen kann.

Zudem kommt dem Unterschied der Survivinspleißvarianten, den daraus resultierenden Isoformen und deren subzellulären Lokalisationen mit entsprechenden Funktionen, eine große tumorbiologische Bedeutung zu [63, 64]. In unseren Untersuchungen konnte zwischen den Spleißvarianten immunhistochemisch nicht differenziert werden. Insgesamt zeigt die Datenlage ein differentes tumorbiologisches Verhalten von Survivin in den einzelnen Tumorentitäten auf. Um dies ausführlicher und besser zu verstehen, sollten molekulare Charakterisierungen von Survivin mit den entsprechenden Funktionsmechanismen in den subzellulären Kompartimenten der verschiedenen Tumorarten erfolgen. Hieraus könnte sich ein Biomarker Profil für die jeweilige Entität erstellen lassen, aus dem sich dann möglicherweise neue therapeutische Ansätze ergeben.

5.2 Carboanhydrase 9 - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen

Die CA9 wurde erstmals 1992 beschrieben und ist ein transmembranäres Protein mit physiologischen Funktionen, welches sich in normalen humanen Geweben bzw. Zellen nachweisen lässt. Aber auch in malignen Zellpopulationen findet sich häufig eine Überexpression des Proteins [113 – 117]. Unsere immunhistochemischen Untersuchungen schlossen ebenfalls primär alle 50 Fälle ein, da keine signifikanten Unterschiede im membranären Expressionsmuster für beide Entitäten bestanden. Die multivariate Analyse erbrachte keine signifikanten Ergebnisse für die zusammengefassten Fälle. Interessanterweise zeigte die Einzelanalyse für die Synovialsarkome eine signifikante Korrelation zum tumorspezifischen Überleben. Patienten mit einer schwachen Expression hatten eine deutlich schlechtere Prognose gegenüber der Referenzgruppe, welche keine Expression der CA9 aufwies (RR=12,731; $p=0,025$). Die Einzelanalyse der Leiomyosarkome ergab ein eher umgekehrtes Bild, wobei die beste Prognose die Patientengruppe mit der schwachen Expression und die schlechteste Prognose die Patientengruppe ohne Expression hatte (RR=3,3; $p=0,43$). Leider ergab sich hierfür keine statistische Signifikanz. Durch die Adjustierung unseres multivariaten Cox-Regressionsmodells nach klinisch relevanten Faktoren, kann CA9 als ein unabhängiger prognostischer Marker in Synovialsarkomen in dieser Arbeit beschrieben werden, aber dieses Ergebnis muss in einer größeren unabhängigen Weichteilsarkom-Patientenkohorte überprüft werden.

Es gibt bisher wenige aussagekräftige, vor allem immunhistochemische Untersuchungen in Weichteilsarkomen hinsichtlich der CA9-Expression und deren Korrelationen. Maseide et al. untersuchten 47 Weichteilsarkome immunhistochemisch auf deren CA9-Expression und konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überexpression und einem schlechteren Gesamtüberleben aufzeigen [119]. In einer neueren Untersuchung von Smeland et al., welche die prognostischen Auswirkungen von Hypoxiemarkern in 206 Weichteilsarkomen immunhistochemisch untersuchten, konnte lediglich ein Trend hinsichtlich einer negativ assoziierten Prognose bei CA9 Überexpression in einer univariaten Analyse gezeigt werden [172]. Insgesamt divergieren die Ergebnisse auch für andere Malignomarten. Kappler et al. bestätigten die CA9 und HIF-1 α Über- bzw. Coexpression in Kopf-Hals Tumoren als prognostisch relevant hinsichtlich des Gesamtüberlebens [115]. Vergleichbar waren die Ergebnisse von Eckert et al., welche immunhistochemische Untersuchungen an oralen Plattenepithelkarzinomen durchführten. Sie konnten nachweisen, dass eine niedrige Coexpression von HIF-1 α und CA9 signifikant mit einer besseren Prognose bezüglich des tumorbedingten Überlebens einhergeht [173]. Auch in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen konnte eine Überexpression von CA9 als unabhängiger prognostischer Marker hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des krankheitsspezifischen Überlebens etabliert werden [174]. Demgegenüber stehen Ergebnisse z.B. für klarzellige Nierenzellkarzinome, bei denen eine CA9 Überexpression nicht als unabhängiger prognostischer Marker assoziiert ist [175]. Darüber hinaus könnten aber auch Mutationen im CA9 Gen, wie kürzlich für Fibrosarkome des Knochens beschrieben, möglicherweise für weitere Sarkomentitäten auftreten und die CA9-Expression beeinflussen [176].

Bezüglich unserer Untersuchungen konnten wir ebenfalls heterogene bzw. divergente Ergebnisse innerhalb der Sarkomentitäten aufzeigen, was die bisherige Datenlage unterstützte. Eine weitere differenzierte Betrachtung der einzelnen Entitäten, bei entsprechend höheren Fallzahlen, ist sicherlich sinnvoll. So zeigt sich die CA9-Expression in Tumoren fokal, vor allem im Bereich von Nekrosen. Dieser Aspekt ist eng mit der Hypoxie in Tumoren und damit einhergehenden Einflussgrößen bzw. Cofaktoren, wie z.B. Tumorgröße, Angiogenese und Transkriptionsfaktoren (HIF-1 α) verknüpft, welche mit in die Betrachtung einfließen sollten um entsprechende diagnostische, therapeutische und prognostische Aussagen zu treffen [114]. So unterscheiden sich häufig die Tumorgrößen der unterschiedlichen Entitäten bei Diagnosestellung, welche nicht Bestandteil unserer Berechnungen waren, wobei bisher keine signifikante Korrelation zwischen Tumorgröße und CA9-Expression gefunden wurde [121]. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus dem retrospektiven Charakter der

Untersuchung, bei der eine in vivo - Untersuchung der Tumoren auf Hypoxie nicht möglich war. Dies kann nur über Elektroden bzw. spezifische Tracer unter indirekter Darstellung durch ein PET-CT realisiert werden [177]. Daraus könnten sich genauere Ergebnisse in Bezug zur tatsächlichen Hypoxie der einzelnen Entitäten herleiten lassen. Mittlerweile gibt es im Rahmen des sog. Drug Targeting speziell entwickelte Inhibitoren auch für CA9, welche in klinischen Studien hinsichtlich spezifischer Behandlungsstrategien erforscht werden [178]. Somit sollten weitere Studien zur Bedeutung der CA9-Expression in Weichteiltumoren erfolgen, um die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zu verbessern.

5.3 Osteopontin - Expression in Synovial- und Leiomyosarkomen

Das multifunktionale Protein Osteopontin wurde erstmals 1979 isoliert. Es wird in vielen gesunden menschlichen Zelltypen exprimiert [134 – 136]. Eine Überexpression findet sich in zahlreichen Malignomen. Mittlerweile sind mehr als 30 Tumorarten bekannt, u.a. auch Weichteiltumore, bei denen sich Assoziationen hinsichtlich der Prognose nachweisen lassen [131, 132]. Wir werteten initial 49 Fälle immunhistochemisch aus, wobei sich keine signifikanten Assoziationen zur Prognose ergaben. In den Einzelanalysen der Entitäten ergaben sich erstaunlicherweise für die Synovialsarkome, wie auch bei den CA9 Auswertungen, signifikante Assoziationen zum tumor-spezifischen Überleben. Die Patientengruppe mit einer negativen Expression in den Tumoren, hatte gegenüber der Gruppe mit der schwachen Expression, die schlechteste Prognose (RR=5,81; p=0,034). Für die Leiomyosarkome zeigte sich, wenn auch nicht signifikant, ein ganz anderes Ergebnis. Hier hatte die Patientengruppe mit der moderat/starken Färbung die schlechteste Prognose gegenüber der Gruppe mit negativen Färbungen (RR=5,1; p=0,144). Somit könnte OPN ein unabhängiger Prognosemarker in Leiomyosarkomen sein.

OPN konnte in verschiedenen Studien als prognostischer Marker identifiziert werden. Im Einführungsteil dieser Arbeit ist bereits darauf eingegangen worden. Im Folgenden sollen reflektierend nochmals weitere Hinweise aufgeführt werden. Bache et al. untersuchten 93 Weichteilsarkome auf die OPN-Expression im Serum und im Tumorgewebe mittels ELISA-Test und konnten neben signifikanten Assoziationen zwischen einzelnen klinischen Parametern, einen signifikanten Zusammenhang zum tumorbedingten Versterben finden [131]. Hahnel et al. konnten anhand der OPN – Splicevarianten und deren Überexpression, ebenfalls auf m-RNA Ebene, in Weichteiltumoren eine Korrelation zur negativen Prognose nachweisen. Sie

untersuchten 124 Sarkome und werteten diese mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse aus. Dabei wiesen speziell OPN-a und OPN-b Überexpressionen signifikante Korrelationen zum tumorbedingten Versterben (Risikoerhöhung) auf [135]. Somit stellt OPN einen wichtigen prognostischen Faktor in Weichteilsarkomen dar. Aber auch in anderen Tumoren konnte OPN als prognostischer Biomarker identifiziert werden. Ying et al. untersuchten multivariat die OPN-Expression im Serum und immunhistochemisch in 83 hepatozellulären Karzinomen (HCC). Patienten mit einer OPN – Überexpression in den Tumoren, hatten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben [179]. Ein ähnliches Ergebnis konnten Rud et al. für nicht kleinzellige Bronchialkarzinompatienten aufzeigen. Sie untersuchten über 200 Karzinome immunhistochemisch, bei denen eine starke OPN-Expression nach multivariater Analyse mit einer signifikant schlechteren Prognose in Bezug zum Gesamtüberleben assoziiert war [180]. In Zusammenhang mit unserer Arbeit differierten die Ergebnisse für die Synovialsarkome insofern, dass Patienten mit Tumoren ohne OPN-Expression die schlechteste Prognose hatten. Für die Leiomyosarkome zeigten sich die Ergebnisse, wenn auch nicht signifikant, konform mit oben genannten Arbeiten, d.h. Patienten mit einer OPN – Überexpression in ihren Tumoren, hatten die schlechteste Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Eine mögliche Erklärung hierfür, ist in der Komplexität der Tumorzellbiologie zu suchen, in der OPN eine wesentliche Rolle spielt und durch bestimmte Faktoren zusätzlich beeinflusst wird. So wird OPN z.B. als potentieller Hypoxiemarker diskutiert [136]. Die OPN-Expression unter Hypoxie unterscheidet sich in verschiedenen Tumorzelllinien. Le et al. untersuchten sieben verschiedene Tumorzelllinien und konnten zeigen, dass die OPN-Expression vom Zelltyp bzw. der Zelllinie abhängig ist. Auch konnte z.B. in Kopf-Hals Tumoren eine Assoziation zwischen einer Überexpression bzw. hohen Plasmakonzentrationen von OPN und stärker hypoxischen Tumorarealen nachgewiesen werden. Gleichzeitig war diesbezüglich eine schlechtere Prognose für die Patienten zu verzeichnen [137]. Bache et al. wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen positiven OPN Färbungen und einer erhöhten HIF - 1 α Expression, sowie eine erhöhte OPN - Expression bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck nach [181]. Demgegenüber stehen Ergebnisse, bei denen unter hypoxischen und anoxischen Bedingungen die OPN Level (qRT-PCR, Westernhybridisierung) in z.B. Plattenepithelkarzinomen der Kopf/Hals Region, Lungenkarzinomen, Glioma und kolorektalen Karzinomen nicht anstiegen bzw. sich verringerten. Zudem zeigten die Arbeitsgruppen auf, dass die OPN-Expression von zusätzlichen Faktoren, wie z.B. dem Glucosegehalt und dem pH – Wert, in den Tumorzellen abhängig ist und stellten einen möglichen Zusammenhang dar [182, 183].

Nach Betrachtung unserer OPN Ergebnisse fiel auf, dass die Assoziationen für die Synovialsarkome und die Leiomyosarkome invers gegenüber den Auswertungen für CA9 waren. Aufgrund der bekannten OPN Coexpression mit HIF - 1 α [181], war dies für beide Entitäten nicht zu erwarten, zumal die CA9-Expression unter hypoxischen Bedingungen durch akkumuliertes Hif - 1 α aktiviert wird. Dies zeigte noch genauer, wie komplex offensichtlich das Tumorzellverhalten der einzelnen Sarkomentitäten ist und welcher zusätzliche Klärungsbedarf sich dadurch ergibt. Unter Einbeziehung der Hypoxie, aber auch des Glucosegehaltes und des pH Wertes der Zelle in Bezug zu OPN und weiterer Biomarker, ließen sich möglicherweise zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich des Tumorzellverhaltens gewinnen.

6. Zusammenfassung

Sarkompatienten stellen aufgrund der Rarität der Tumoren ein besonderes Patientengut dar. Die therapeutischen Möglichkeiten bzw. Strategien seitens der Chirurgie und der Onkologie, konnten aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt und verbessert werden. Die Identifizierung und Suche von Prognosefaktoren, ist ein wichtiger Baustein der derzeitigen onkologischen Forschung. Unter diesen Prognosefaktoren sind die Proteine Survivin, Carboanhydrase 9 und Osteopontin wichtige Vertreter, welche in vielen Malignomen, auch in Sarkomen bisher identifiziert wurden. Sie sind vor allem in Karzinomen, aber noch nicht umfassend in Sarkomen untersucht wurden. Alle 3 Proteine haben gemeinsam, dass sie maßgeblich auf das Tumorzellüberleben Einfluss nehmen und damit die Prognose von Krebspatienten nachweislich negativ beeinflussen können. Aufgrund von verringerten apoptotischen Potentialen durch direkte Inhibition der Apoptose bzw. indirekte Mechanismen durch Hypoxie, zeichnen sich Tumorzellen zudem durch eine erhöhte Resistenz gegenüber konventionellen Therapien, wie Chemotherapie und Bestrahlung aus. In dieser Arbeit wurden die Sarkomentitäten der Synovialsarkome und der Leiomyosarkome auf die Proteinexpression von Survivin, CA9 und OPN immunhistochemisch untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, in diesen Sarkomentitäten zu überprüfen, ob diese Proteinmarker unabhängige Prognosefaktoren sind. Zudem gab es bisher nur wenige Studien, welche Survivin, CA9 und OPN in Sarkomen immunhistochemisch multivariat analysiert hatten. Untersucht wurden repräsentativ 26 Synovial- und 24 Leiomyosarkome mittels immunhistochemischer Färbung. Anhand des immunoreaktiven Score nach Remmele und Stegner, erfolgte die Bewertung des Expressionsmusters der 3 Proteine und anschließend wurde mit verschiedenen klinisch-pathologischen Verlaufsparemtern (Tumorgrad, Tumorstadium, Resektionsgrad, Tumorlokalisation) und Überlebensdaten, welche umfangreich ermittelt wurden, eine statistische Analyse durchgeführt.

Wir konnten in dieser Arbeit die Survivin Proteinexpression (zytoplasmatisch und nukleär) als unabhängigen prognostischen Marker für Synovialsarkome und für Leiomyosarkome identifizieren. Zudem konnten für Synovialsarkome signifikante Korrelationen für CA9- und OPN-Expressionen mit dem tumor-spezifischen Überleben gezeigt werden, welche diese Proteinmarker ebenfalls als negative Prognosemarker für diese Sarkomentität interessant machen und in den engeren Fokus bringen.

7. Literaturverzeichnis

1. Weiss, Sharon W., Goldblum, John R. Malignant soft tissue-Tumors of uncertain Type. *Enzinger and Weiss's SOFT TISSUE TUMORS*. Philadelphia : Mosby Elsevier, 2008.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2006, 56:106
3. Schütte J, Stuschke M. Hämatologie - Onkologie. München : Hrsg. Ostendorf PC Arndt R. Urban & Schwarzenberg, 1997.
4. Taubert H, Meye A, Würfl P. prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res*. 1996, 56:4134-4136.
5. Taubert H, Meye A, Würfl P. Soft tissue sarcomas and p53 mutations. *Mol Med*. 1998, 4:365-372.
6. Taubert H, Köhler T, Meye A, Bartel F, Lautenschläger C, Borchert S, Bache M, Schmidt H, Würfl P. mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. *Mol Med*. 2000, 6:50-59.
7. F.-W. Rath, M. Schönfelder. *Weichteilsarkome des Erwachsenen*. Halle Saale/Leipzig : Karger, 2002. 3-8055-7394-4.
8. Schütte J, Hartmann JT, Reichardt P, Issels RD, Tunn PU, Budach V. *Onkopedia - Weichteilsarkome Leitlinie - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen*. Berlin : DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2011.
9. Williard WC, Collin CF, Casper ES, et al. The changing role of amputation for soft tissue sarcoma of the extremity in adults. *Surg Gynecol Obstet*. 1992, 175:389-396.
10. Williard WC, Hajdu SI, Casper ES, et al. Comparison of amputation with limb-sparing operations for adult soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg*. 1992, 215:269-275.
11. Yang JC, Chang AE, Baker AR, et al. A randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol*. 1998, 16:197-203.
12. Coindre JM, Terrier P, Bui NB, Bonichon F, Collin F, Le DV, Mandard AM, Vilain MO, Jacquemier J, Duplay H, Sastre X, Barlier C, Henry-Amar M, Mace-Lesech J, Contesso G. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J Clin Oncol*. 1996, 14:869-877.
13. Weiss, Sharon W. and Goldblum, John R. *Enzinger and Weiss's SOFT TISSUE TUMORS Fourth edition*. St. Louis, Missouri : Mosby, 2001. pp. 1483-1509.
14. Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, et al. Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multiinstitutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res*. 2002, 62:135-140.

15. T.Klingebl, E.Koscielniak. Weichteilsarkome. [book auth.] Rübben. *Uroonkologie*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2009.
16. Guillou L, Wadden C, Kraus MD et al. S-100 protein reactivity in synovial sarcomas:a potentially frequent diagnostic pitfall;immunohistochemical analysis of 100 cases. *Appl Immunohistochem*. 1996, 4:167.
17. Terry J, Saito T, Subrmanian S, et al. TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies. *Am J Surg Pathol*. 2007, 31:240-246.
18. Kosemehmetoglu K, Vrana J, Folpe A, et al. TLE1 expression is not specific for synovial sarcoma: a whole section study of 163 soft tissue and bone neoplasms. *Modern Pathology*. 2009, 22, pp 872-878.
19. R.Penzel, P.Schirmacher, M.Renner und G.Mechtersheimer. Molekularpathologie maligner Weichgewebetumoren. [Buchverf.] Hartmann, Budach Schlag. *Weichgewebetumoren - Interdisziplinäres Management*. Berlin Heidelberg : Springer pp 23-35, 2011.
20. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors.Synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002, 133:1-23.
21. D'arcy P, Maruwge W, Ryan BA, Brodin B. The oncoprotein SS18-SSX1 promotes p53 ubiquitination and degradation by enhancing HDM2 stability. *Mol Cancer Res*. 2008, 6:127-138.
22. Fehr, Fink. Maligne, nichtepitheliale Tumoren des Corpus uteri. [Buchverf.] Jonat, Fink, Köchli Petru. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag, 2011.
23. Fletcher DM, Unni KK, Mertens F. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon(Frankreich) : IARC, 2002.
24. Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *J Surg Oncol*. 1985, 28:177-186.
25. Shmookler BM, Lauer DH. Retroperitoneal leiomyosarcoma: a clinicopathologic analysis of 36 cases. *Am J Surg Pathol*. 1983, 7:269-280.
26. Ranchod M, Kempson RL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum. *Cancer*. 1977, 39:255-262.
27. De Saint Aubain Sommerhausen N, Fletcher CDM. Leiomyosarcoma of soft tissue in children: clinicopathologic analysis of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 1999, 23:755-763.
28. Swanson PE, Wick MR, Dehner LP. Leiomyosarcoma of somatic soft tissue in childhood: an immunohistochemical analysis of six cases with ultrastructural correlation. *Human Pathology*. 1991, Vol. 22, 6, pp 569-577.
29. Oda Y, Miyajima K, Kawaguchi K, et al. Pleomorphic leiomyosarcoma: clinicopathologic and immunohistochemical study with special emphasis on its distinction from ordinary leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Am J Surg Pathol*. 2001, 25:1030-1038.

30. Rangdaeng S, Truong LD. Comparative immunohistochemical staining for desmin and muscle specific actin: a study of 576 cases. *Am J Clin Pathol.* 1991, 96:32-45.
31. Swanson PE, Stanley MW, Scheithauer BW, et al. Primary cutaneous leiomyosarcoma: a histologic and immunohistochemical study of 9 cases with ultrastructural correlations. *J Cutan Pathol.* 1988, 15:129-141.
32. Hisaoka M, Wei-Qui S, Jian W, et al. Specific but variable expression of h-caldesmon in leiomyosarcomas: an immunohistochemical reassessment of a novel myogenic marker. *Appl Imm Mol Morph.* 2001, 9:302-308.
33. Stoeckle E, Coindre JM, Bonvalot S et al. Prognostic factors in retroperitoneal sarcoma: a multivariate analysis of a series of 165 patients of the French Federation Sarcoma Group. *Cancer.* 2001, 92:359-368.
34. Gustafson P, Willen H, Baldetorp B, et al. Soft tissue leiomyosarcoma : a population-based epidemiologic and prognostic study of 48 patients, including cellular DNA content. *Cancer.* 1992, 70:114-119.
35. Miyajima K, Oda Y, Oshiro Y, et al. Clinicopathologic prognostic factors in soft tissue leiomyosarcomas: a multivariate analysis. *Histopathology.* 2002, 40:353-359.
36. Mankin HJ, Casas-Ganem J, Kim JI, et al. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues. *Clinical Orthopaed Relat Res.* 2004, 421:225-231.
37. Farshid G, Pradhan M, Goldblum J, et al. Leiomyosarcomas of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002, 26:14-24.
38. Berlin O, Stener B, Kindblom L, et al. Leiomyosarcomas of venous origin in the extremities: a correlated clinical, roentgenologic and morphologic study with diagnostic and surgical implications. *Cancer.* 1984, 54:2147-2159.
39. Vaux, DL and Korsmeyer, SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999; 96(2):245-54.
40. Reed, JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:2941-2953.
41. SJ, Martin. *Apoptosis and Cancer: An overview and apoptosis: An introduction; in Martin SJ (ed): Apoptosis and cancer.* Basel : Karger Landes System, 1997, pp 9-24.
42. Cory S, Adams JM. The Bcl2 Family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2: 647-656.
43. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999, 13: 239-252.
44. Adida C, Grotty PL, Mc Grath J, Berrebi D, Diebold J and Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol.* 1998, 152: 43-49.
45. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis . *Nat Rev Cancer.* 2002, 2: 277-288.

46. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000, 21: 485-495.
47. Schimmer AD Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004, 64: 7183-7190.
48. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993, 67: 2168-2174.
49. Clem RJ, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol*. 1994, 14: 5212-5222.
50. Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol*. 1998, 13: 3300-3309.
51. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new signalling motif. *Trends Biochem Sci*. 1997, 22: 155-156.
52. Joazeiro CA, Weissman AM. RING-finger-Proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 2000, 102: 549-552.
53. Seshagiri S, Miller LK. Caenorhabditis elegans CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3 induced apoptosis. *Curr Biol*. 1997, 7: 455-460.
54. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP Proteins. *Cell*. 2000, 102: 43-53.
55. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 2002, 277: 439-444.
56. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000, 102: 33-42.
57. Mohabat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2014, 15: 2494-2516.
58. Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997, 3: 917-921.
59. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri D C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*. 1998, 273:11177-11182.
60. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 314:902-907.
61. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer*. 2005, 4(1):11.
62. Gadek-Wesierska J, Schmid G. Transcriptional repression of anti-apoptotic proteins mediated by the tumor suppressor protein p53. *Cancer Therapy*. 2007, 5:203-212.

63. Mathoka C, Liebmann J, Wenzel M et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ.* 2002b, 9:1334-1342.
64. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2003b, 3:46-54.
65. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006, 5:1087-1098.
66. Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A. Essential role of Survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T-Cell development, maturation and homeostasis. *J Exp Med.* 2004, 199:69-80.
67. Altnauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thurig C, Schmid I, Conway EM, Schoni MH, Vogt P, Mueller C, Fey MF et al. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med.* 2004, 199:1343-1354.
68. Gurbuxani S, Xu Y, Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD. Differential requirements for survivin in haematopoietic cell development. *Proc Natl Acad Sci.* 2005, 102:11480-11485.
69. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD 34(+) cells by hematopoietic growth factors: Implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood.* 2001, 98:2091-2100.
70. Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol.* 2001, 158:1757-1765.
71. Chiou SK, Moon WS, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin Expression in stomach: Implications for mucosal integrity and protection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 305:374-379.
72. Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, Sugimoto T, Sakai T, Ohmori S, Murata K et al. Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 297:59-64.
73. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003, 22:8581-8589.
74. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet.* 1998, 351:882-883.
75. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000, 6:127-134.
76. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998, 58:5071-5074.
77. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1998, 58:1808-1812.

78. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol.* 1999, 17:2100-2104.
79. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000, 96:1921-1925.
80. Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Agliano AM. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J Clin Oncol.* 2003, 21:306-312.
81. Kappler M, Kotsch M, Bartel F, Füssel S, Lautenschläger C, Schmidt U, Würfl P, Bache M, Schmidt H, Taubert H, Meye A. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res.* 2003, 9:1098-1104.
82. Li, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of Apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998, 396:580-584.
83. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci.* 2002, 115:575-585.
84. Jeyapragakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 2007, 131: 271-285.
85. Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol.* 2001, 11:886-890.
86. Vagnarelli P, Earnshaw W C. Chromosomal passenger: The four-dimensional regulation of mitotic event. *Chromosoma.* 2004, 113: 211-222.
87. O'Connor DS, Grossmann D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:13103-13107.
88. Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaktion with Cdk4 to resist Fas-mediated cell-death. *Oncogene.* 2000, 19:1346-1353.
89. Azuhata T, Scott D, Griffith TS, Miller M, Sandler AD,. Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma . *J Pediatr Surg.* 2006, 41:1431-1440.

90. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998, 58:5315-5320.
91. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96:1457-1462.
92. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry.* 2001, 40:1117-1123.
93. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC., Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood.* 2000, 96:4002-4003.
94. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol.* 2000, 7:602-608.
95. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsch K et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 2003, 22:2729-2740.
96. Dohi T, Okada K, Xia F et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem.* 2004, 279:34087-34090.
97. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene.* 2002, 21:2613-2622.
98. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family proteins survivin and XIAP by VEGF by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 264:781-788.
99. Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, Mimata H. Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2005, 14:993-997.
100. Tirro E, Consoli ML, Massimino M, Manzella L, Frasca F, Sciacca L, Vicari L, Stassi G, Messina L, Messina A, et al. Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* 2006, 66:4263-4272.
101. Rodel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rodel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: Survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003, 55:1341-1347.
102. Vallböhmer D, Drebber U, Schneider PM, Baldus S, Bollschweiler E, Brabender J, Mönig S, Hölscher AH, Metzger R. Survivin expression in gastric cancer: Association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis. [book auth.] Schackert HK, Bauer H Arbogast R. *Chirurgisches Forum 2008 für experimentelle und klinische Forschung.* Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2008.
103. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med.* 2007, 85(12): 1301-1307.

104. P, Kolstad. Intercapillary distance, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer . *Scand J Clin Lab Invest Suppl Dev.* 1968, 21(106):145-157.
105. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26:225-239.
106. Chan N, Milosevic M, Bristow R. Tumor hypoxia, DNA repair and prostate cancer progression: new targets and new therapies. *Future Oncol.* 2007, 3:329-341.
107. Nordsmark M, Bentzen S, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005, 77:18-24.
108. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996, 56:4509-4515.
109. Brizel D, Scully S, Harrelson J, Layfield L, Bean J, Prosnitz L, Dewhirst M. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996, 56:941-943.
110. Shannon A, Bouchier-Hayes D, Condron C, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev.* 2003, 29:297-307.
111. Gray LH, Gonger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol Dev.* 1953, 26:638-648.
112. Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M. A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell.* 1998, 2:259-265.
113. Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M, Babusikova O, Zevada J,. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two component system. *Virology.* 1992, 187:620-626.
114. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavadova J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001, 158:905-919.
115. Kappler M, Taubert H, Holzhausen HJ, Reddemann R, Rot S, Becker A, Kuhnt T, Dellas K, Dunst J, Vordermark D, Hänsgen G, Bache M. Immunohistochemical detection of HIF-1alpha and CAIX in advanced head-and-neck cancer. Prognostic role and correlation with tumor markers and tumor oxygenation parameters. *Strahlenther Onkol.* 2008, 184(8):393-399.
116. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, Taub N, Harris AL, O'Byrne KJ. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003, 21:473-482.
117. Liao SY, Brewer C, Závada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A, Berman ML, DiSaia PJ, Stanbridge EJ. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J Pathol.* 1994, 145:598-609.

118. Klimowicz AC, Bose P, Petrillo SK, Magliocco AM, Dort JC, Brockton NT. The prognostic impact of a combined carbonic anhydrase IX and Ki67 signature in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013, 109:1859-1866.
119. Måseide K, Kandel RA, Bell RS, Catton CN, O'Sullivan B, Wunder JS, Pintilie M, Hedley D, Hill RP. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2004, 10:4464-4471.
120. Capkova L, Koubkova L, Kodet R. Expression of carbonic anhydrase IX (CAIX) in malignant mesothelioma. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Neoplasma*. 2014, 61:161-169.
121. Span PN, Bussink J, Manders P, Beex LV, Sweep CG. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer*. 2003, 89:271-276.
122. Muriel López C, Esteban E, Berros JP, Pardo P, Astudillo A, Izquierdo M, Crespo G, Sanmamed M, Fonseca PJ, Martínez-Cambor P. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2012, 10:262-270.
123. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformation-specific secreted phosphoproteins. *Nature*. 1980, 286:619-621.
124. Crosby AH, Lyu MS, Lin K, McBride OW, Kerr JM, Aplin HM, Fisher LW, Young MF, Kozak CA, Dixon MJ. Mapping of the human and mouse bone sialoprotein and osteopontin loci. *Mamm. Genome*. 1996, 7:149-151.
125. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993, 7:1475-1482.
126. Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. Expression of osteopontin of human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest*. 1995, 72:55-63.
127. Ahmed M, Behera R, Chakraborty G, Jain S, Kumar V, Sharma P, Bulbule A, Kale S, Kumar S, Mishra R, Raja R, Saraswati S, Kaur R, Soundararajan G, Kumar D, Thorat D, Sanyal M, Ramdasi A, Ghosh P, Kundu GC. Osteopontin: a potentially important therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011, 15(9):1113-1126.
128. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*. 1999, 162:1024-1031.
129. GF, Weber. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochem Biophys Acta*. 2001, 1552:61-85.
130. LF, Brown. Expression and distribution of osteopontin in human tissues:widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*. 1992, 3:1169-1180.
131. Bache M, Kappler M, Wichmann H, Rot S, Hahnel A, Greither T, Said HM, Kotzsch M, Würfl P, Taubert H, Vordermark D. Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. *BMC Cancer*. 2010, 10:132.

132. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, et al. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate and lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001, 7:4060-4066.
133. Bramwell VH, Tuck AB, Wilson SM, Stitt LW, Cherian AK, Rorke SC, Al-Katib W, Postenka CO, Chambers AF. Expression of Osteopontin and HGF/met in adult soft tissue tumors. *Cancer Biol Ther.* 2005, 4:1336-1341.
134. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncol Rep.* 2011, 25:433-441.
135. Hahnel A, Wichmann H, Greither T, Kappler M, Würfl P, Kotsch M, Taubert H, Vordermark D, Bache M. Prognostic impact of mRNA levels of osteopontin splice variants in soft tissue sarcoma patients. *BMC Cancer.* 2012, 12:131.
136. Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D. Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem.* 2008, 15:322-338.
137. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SC, Terris DJ, Lin HS, Lum B, Pinto HA, Koong AC, Giaccia AJ. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003, 9:59-67.
138. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of Osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol.* 2004, 26:179-184.
139. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin - a molecule for all seasons. *QJM.* 2002, 95:3-13.
140. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signalling and cancer progression. *Trends in Cell Biol.* 2006, 16:79-87.
141. Matusan IK, Behrem S, Jonjic N et al. Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2008, 14:293-298.
142. Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res.* 2004, 121:228-241.
143. Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science.* 2007, 316:1148-1153.
144. Senger DR, et al. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochem Biophys Acta.* 1989, 996:43-48.
145. Zheng W, Li R, Pan H et al. Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein1 and macrophage inflammatory protein 1beta through the NF-kappaB and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009, 60:1957-1965.
146. Yokasaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D. The integrin alpha9beta1 binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem.* 1999, 274:36328-36334.

147. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 280:460-465.
148. Fisher LW, Jain A, Tayback M, Fedarko NS. Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:8501-8511.
149. Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell.* 2004, 15:2834-2841.
150. Noti JD, et al. Adherence to osteopontin via alphabeta3 suppresses phorbol ester-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells that overexpress protein kinase C-alpha. *Int J Oncol.* 2000, 17:1237-1243.
151. Liu J, et al. Osteopontin promotes the progression of gastric cancer through the NF-kB pathway regulated by the MAPK and PI3K. *Int J Oncol.* 2014, 45:282-290.
152. Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, Fisher LW, Sorensen ES, Denhardt DT. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J Cell Biochem.* 2002, 85:728-736.
153. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of Osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol.* 2004, 26:179-184.
154. Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of the matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003, 200:448-464.
155. Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem.* 2003, 278:14487-14497.
156. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphabeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996, 149:293-305.
157. Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, Fisher LW, Sørensen ES, Denhardt DT. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J Cell Biochem.* 2002, 85:728-736.
158. Trojani M., Contesso G., Coindre JM., Rouesse J., Binh Bui N., de Mascarel A., Goussot JF., David M., Bonichon F., Lagarde C. Soft tissue sarcoma: Study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer.* 1984, 33: 37-42.
159. Myhre Jensen O, Kaae S, Madsen EH, et al. Histopathological grading in soft-tissue tumours: relation to survival in 261 surgically treated patients. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1983, 91:145-150.
160. Costa J, Wesley RA, Glatstein E, et al. The grading of soft tissue sarcomas: results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases. *Cancer.* 1984, 53:530-541.

161. Coindre JM, Trojani M, Contesso G. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer*. 1986, 58: 306-309.
162. Hashimoto H, Daimaru Y, Takeshita S, et al. Prognostic significance of histologic parameters of the soft tissue sarcomas. *Cancer*. 1992, 70:2816-2822.
163. van Unnik JAM, Coindre JM, Contesso C, Albus Lutter CE, Schiødt T, Thomas D, Bramwell V, Mouridsen HAT. Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group . *Eur J Cancer* . 1993, 29A:2089-2093.
164. Bourne, Janice A. Färbemethoden. *Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden*. 6392 Via Rea, Carpinteria, CA 93013, USA : DAKO CORPORATION, 1989.
165. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet*. 1999, 23:387-388.
166. Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 2002, 11:33-40.
167. Demir D, Yaman B, Anacak Y, Keçeci B, Kandiloğlu G, Akalin T. Prognostic significance of bcl-2, c-myc, survivin and tumor grade in synovial sarcoma. *Turk Pathol Derg*. 2014, 30:55-65.
168. Hingorani P, Dickman P, Garcia-Filion P, White-Collins A, Kolb EA, Azorsa DO. BIRC5 expression is a poor prognostic marker in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013, 60:35-40.
169. Caldas H, et al. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *J Med Genet*. 2006, 43:119-128.
170. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival . *Eur J Surg Oncol*. 2003, 29:379-382.
171. Li F, Yang J, Ramnath N et al. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer* . 2005, 114:509-512.
172. Smeland E, Kilvaer TK, Sorbye S, Valkov A, Andersen S, Bremnes RM, Busund LT, Donnem T. Prognostic impacts of hypoxic markers in soft tissue sarcoma. *Sarcoma*. 2013, 2012:541650.
173. Eckert AW, Lautner MH, Schütze A, Bolte K, Bache M, Kappler M, Schubert J, Taubert H, Bilkenroth U. Co-expression of Hif1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med*. 2010, 39:313-317.
174. Ilie M, Mazure NM, Hofman V, Ammadi RE, Ortholan C, Bonnetaud C, Havet K, Venissac N, Mograbi B, Mouroux J, Pouyssegur J, Hofman P. High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2010, 102(11):1627-1635.

175. Zhang BY, Thompson RH, Lohse CM, Dronca RS, Cheville JC, Kwon ED, Leibovich BC. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is not an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2007, 25(30):4757-4764.
176. Sarhadi VK, Lahti L, Scheinin I, Ellonen P, Kettunen E, Serra M, Scotlandi K, Picci P, Knuutila S. Copy number alterations and neoplasia-specific mutations in MELK, PDCD1LG2, TLN1, and PAX5 at 9p in different neoplasias. *Gen Chrom Canc*. 2014, 53(7):579-588.
177. Lapi SE, Voller TF, Welch MJ. Positron emission tomography imaging of hypoxia. *PET Clinics*. 2009, 4:39-47.
178. Thiry A, Dogne JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2006, 27:566-573.
179. Ying X, Zhao Y, Wang JL, Zhou X, Zhao J, He CC, Guo XJ, Jin GH, Wang LJ, Zhu Q, Han SX. Serum anti-osteopontin autoantibody as a novel diagnostic and prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2014, 32(4):1550-1556.
180. Rud AK, Boye K, Oijordsbakken M, Lund-Iversen M, Halvorsen AR, Solberg SK, Berge G, Helland A, Brustugun OT, Maelandsmo GM. Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2013, 13:540.
181. Bache M, Reddemann R, Said HM, Holzhausen HJ, Taubert H, Becker A, Kuhnt T, Hänsgen G, Dunst J, Vordermark D. Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1 alpha related markers, and hemoglobin levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006, 66:1481-1487.
182. Sorensen BS, Alsner J, Overgaard J, Horsman MR. Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by pH. *Radiother Oncol* . 2007, 83:362-366.
183. Said HM, Katzer A, Flentje M, Vordermark D. Response of the plasma hypoxia marker osteopontin to in vitro hypoxia in human tumor cells. *Radiother Oncol*. 2005, 76:200-205.

8. Anhang

8.1 Tabellenanhang

IRS Produkt und Verteilung für Svv Zytoplasma – Synovialsarkome/Leiomyosarkome

IRS-Produkt Svv Zyto	Synovialsarkome n=26	Leiomyosarkome n=24	Gesamt n=50
0	1	1	2
1	0	0	0
2	3	3	6
3	4	2	6
4	2	7	9
6	4	6	10
8	5	4	9
9	5	1	6
12	2	0	2

IRS Produkt und Verteilung für Svv Kern – Synovialsarkome/Leiomyosarkome

IRS-Produkt Svv Kern	Synovialsarkome n=26	Leiomyosarkome n=24	Gesamt n=50
0	17	12	29
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	8	10
4	0	0	0
6	7	4	11
8	0	0	0
9	0	0	0
12	0	0	0

IRS Produkt und Verteilung für CA9 – Synovialsarkome/Leiomyosarkome

IRS-Produkt CA9	Synovialsarkome n=26	Leiomyosarkome n=24	Gesamt n=50
0	10	3	13
1	1	3	4
2	3	2	5
3	4	2	6
4	3	7	10
6	4	5	9
8	0	0	0
9	1	2	3
12	0	0	0

IRS Produkt und Verteilung für OPN – Synovialsarkome/Leiomyosarkome

IRS-Produkt OPN	Synovialsarkome n=26	Leiomyosarkome n=23	Gesamt n=49
0	14	12	26
1	1	1	2
2	2	3	5
3	5	0	5
4	1	6	7
6	3	0	3
8	0	0	0
9	0	1	1
12	0	0	0

Verteilung der Tumorarten nach der Tumorcharakteristik

	Charakteristik	Primärtumoren	Rezidivtumoren	Metastasen
Tumorart		34	11	5
Leiomyosarkome 24		18	3	3
Synovialsarkome 26		16	8	2

Häufigkeitsverteilung der WTS Entitäten [modif. nach [8]]

WTS – Entität	Häufigkeit
Leiomyosarkom	15-25%
Liposarkome	10-15%
Pleomorphe Sarkome/NOS	15-25%
Synovialsarkome	6-10%
GIST	3-5%
Maligne periph. Nervenscheidentumoren	3-5%
Fibrosarkome	2-3%
Angiosarkome	2-3%
Rhabdomyosarkome	~2%
Endometriale Stromasarkome	1-2%
Epitheloidsarkome	~1%
Klarzellsarkome	~1%
Alveoläre Weichteilsarkome	~1%
Solitäre fibröse Tumoren	~1%
Desmoide / Aggressive Fibromatose	<1%
Dermatofibrosarcoma protuberans	<1%

8.2 Abbildungsanhang

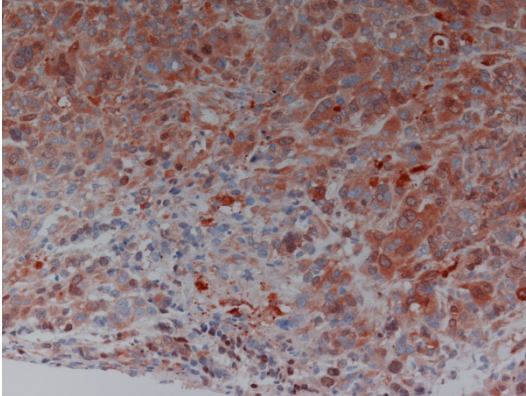


Bild 1: Beispiel zytoplasmatische S100-Färbung (Leiomyosarkom – 200x)

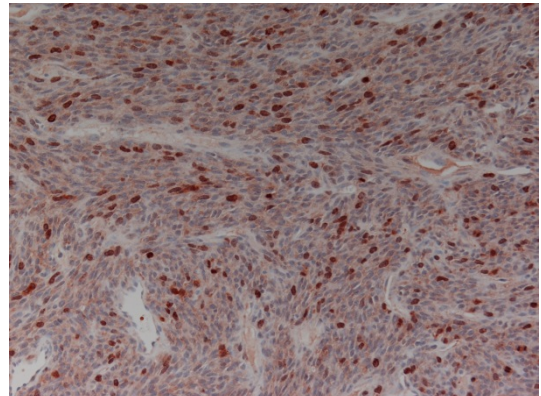


Bild 2: Beispiel zytoplasmatische/nukleäre S100-Färbung (Synovialsarkom-200x)

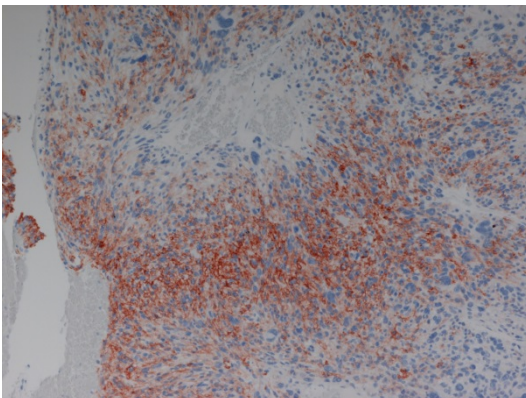


Bild 3: Beispiel CA9-Färbung Zellmembran/Zytoplasma (Leiomyosarkom – 200x)

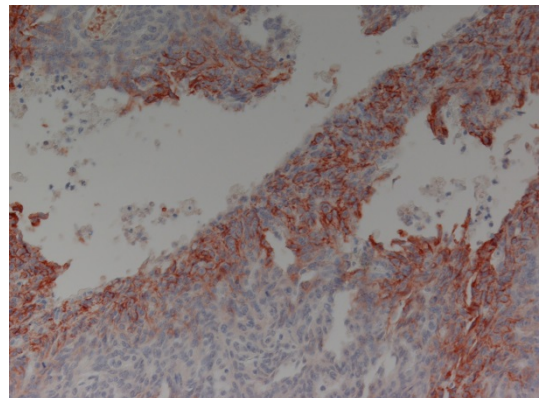


Bild 4: Beispiel CA9-Färbung Zellmembran/Zytoplasma (Synovialsarkom – 200x)

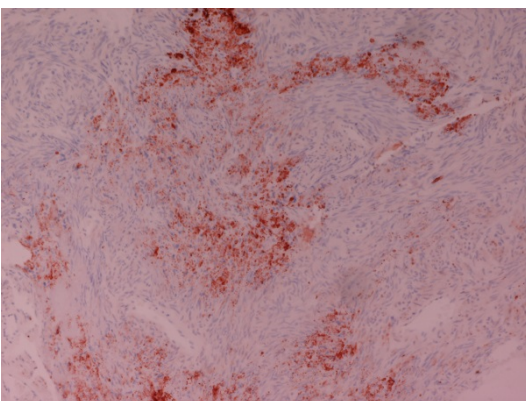


Bild 5: Beispiel OPN-Färbung Zytoplasma (Synovialsarkom)

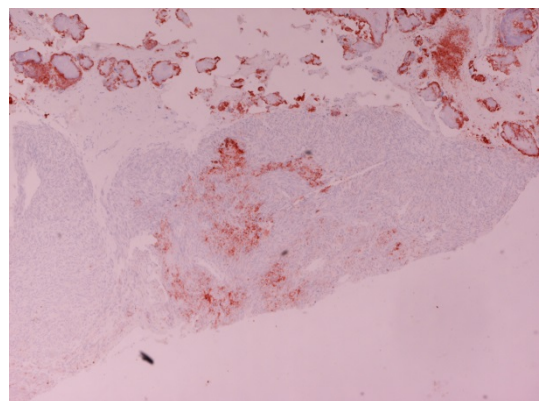


Bild 6: Beispiel OPN-Färbung Zytoplasma (Leiomyosarkom)

9. Thesen

1. Die Identifizierung von molekularen Prognosefaktoren ist heute ein wesentlicher Bestandteil der Tumorforschung. Prognosefaktoren erlauben es, den Krankheitsverlauf statistisch vorherzusagen und entsprechende Behandlungsstrategien sowie Therapieschemata weiterzuentwickeln.
2. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von drei Proteinen, Survivin, Carboanhydrase 9 und Osteopontin, immunhistochemisch in 50 Weichteilsarkomen untersucht und diese hinsichtlich einer Assoziation zum tumor-spezifischen Überleben statistisch analysiert.
3. Der Apoptoseinhibitor Survivin (Svv) ist in vielen Malignomen immunhistochemisch bzw. auf mRNA Ebene nachgewiesen worden. Eine Überexpression ist häufig mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten assoziiert. Auch in Weichteilsarkomen konnte eine Überexpression von Survivin mittels Westernblot und ELISA Nachweis als negativer und unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden.
4. Die Carboanhydrase9 (CA9) wird als sogenannter Hypoxiemarker diskutiert. Eine heterogene Expression bzw. eine Überexpression findet sich in vielen malignen Zellpopulationen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression bzw. Coexpression mit dem Hypoxie-induziertem Faktor HIF-1 α oder dem Proliferationsmarker Ki-67 in verschiedenen Malignomen mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist. Bisher gibt es nur wenige Daten, welche die Carboanhydrase 9 in Weichteilsarkomen als alleinigen prognostischen Marker untersucht haben.
5. Das multifunktionale Glykophosphoprotein Osteopontin (OPN) wird unter hypoxischen Bedingungen in verschiedenen Tumoren überexprimiert. Dies konnte immunhistochemisch, als auch im Plasma von Patienten nachgewiesen werden. Die erhöhten Expressionen und Konzentrationen von OPN sind mit der Tumorprogression, einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert. Eine erhöhte OPN-Expression konnte mittels ELISA-Test in Weichteilsarkomen nachgewiesen werden und erwies sich als negativer unabhängiger Marker bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten.

6. In dieser Arbeit wurden 26 Synovial- und 24 Leiomyosarkome immunhistochemisch untersucht. Hierbei handelt es sich um seltene, hochmaligne Sarkomentitäten, welche häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Ziel dieser Arbeit war es, unabhängige Prognosefaktoren in diesen Sarkomentitäten zu identifizieren.
7. Der immunhistochemische Nachweis gelang für alle 3 Antigene und wurde durch den immunoreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner bewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse.
8. Der immunhistochemische Nachweis der Survivin-Expression, sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch, ist signifikant mit der Prognose für erkrankte Patienten assoziiert. Die Kombination der Expressionen in beiden Kompartimenten, ergab einen additiven Effekt hinsichtlich des Risikos und einer schlechteren Prognose für die Patienten. Somit konnte Survivin als unabhängiger prognostischer Marker in Synovial- und Leiomyosarkomen bestätigt werden.
9. Für eine schwache CA9-Expression ergab sich eine signifikante Korrelation zur Prognose hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens in synovialen Sarkomen. In dieser Arbeit kann CA9 als unabhängiger prognostischer Marker für Synovialsarkome beschrieben werden.
10. Eine negative OPN-Expression war mit einer signifikant schlechteren Prognose hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens für Synovialsarkome assoziiert. Somit kann OPN für diese Sarkomentität ebenfalls als unabhängiger prognostischer Marker in dieser Arbeit beschrieben werden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Chris Heidenreich
geboren am 22.02.1979 in Lutherstadt Eisleben
verheiratet seit 2009

Schulbildung

1985-1992 Grundschule Helbra

1992-1997 Gottfried – August - Bürger Gymnasium Benndorf
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

1998-2001 Ausbildung zum Versicherungskaufmann (IHK)

Hochschulausbildung

2002-2008 Studium der Humanmedizin - Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg

2004 Ärztliche Vorprüfung

2008 Staatsexamen des Studiums der Humanmedizin

Berufserfahrung

2001-2002 Kaufmännischer Angestellter - Nürnberger Versicherung

2007-2008 Praktisches Jahr der Humanmedizin

seit 01.01.2009 Arzt in Weiterbildung, Klinik für Allgemein- und
Viszeralchirurgie Elisabeth Krankenhaus Halle/Saale

Promotion

Seit 2006 Thema: Immunhistochemische Untersuchungen zu
Prognosefaktoren für Patienten mit Synovial- und
Leiomyosarkomen, Institut für Pathologie der MLU
Halle/Wittenberg, Betreuer: Prof. Dr. H. Taubert

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

.....
Chris Heidenreich

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit. Vor allem bedanke ich mich für die Geduld, die zahlreichen Ratschläge und die problemlose Kommunikation. Es war eine herzliche Betreuung. Vielen Dank.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Hans Joachim Holzhausen für die histologische und immunhistochemische Auswertung der Präparate danken.

Ich danke Frau Jana Beer für die tatkräftige Unterstützung, während der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Ehefrau Elisabeth, die mich immer unterstützt und mir Mut gemacht hat. Unsere kleinen Engel, Noah und Sarah, waren abends auch ganz lieb, so dass ich die Arbeit doch noch bewältigen konnte. Ich danke euch von ganzem Herzen.

Auch meinen Eltern danke ich von Herzen. Sie haben mir diesen Weg geebnet und mich immer unterstützt. Ich danke euch.